



**GRUPO DE PRODUÇÃO ACADÊMICA DE CIÊNCIA DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA**

**CAROLINA FERREIRA DA CONCEIÇÃO
ÉRICA BOMFIM ALMEIDA
SILVIA HELENA MAYUMI SHIMOKAWA**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO *KEFIR* SOBRE AS
BACTÉRIAS GRAM POSITIVAS, GRAM NEGATIVAS E
FUNGOS LEVEDURIFORMES.**

**Várzea Grande - MT
2018**

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO *KEFIR* SOBRE AS BACTÉRIAS GRAM POSITIVAS, GRAM NEGATIVAS E FUNGOS LEVEDURIFORMES.

RESUMO

Em resposta ao crescimento da resistência bacteriana aos antimicrobianos, a Organização Mundial de Saúde (2017), publicou sua primeira lista de “agentes patogênicos prioritários” resistentes aos antibióticos com o objetivo de orientar e promover novas pesquisas de substâncias antimicrobianas. O *kefir* é um grão que após adicionado ao leite, ocorre um processo fermentativo, é um probiótico de grande importância na manutenção da saúde, composto por um conjunto de bactérias e fungos que produzem substâncias com atividade antimicrobiana. O intuito desse estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana do substrato do *kefir* frente às bactérias gram-positivas, gram-negativas e fungos leveduriformes. Nessa pesquisa foram utilizados 17 tipos de cepas de bactérias e fungos leveduriformes, realizando o antibiograma pelo método de disco-difusão do CLSI, onde apenas a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* apresentou sensibilidade com a formação de halos de tamanhos 45/40/32/25 mm. É uma bactéria gram-negativa de grande importância em indivíduos imunocomprometidos e um dos principais agentes em infecções hospitalares no Brasil. A partir da padronização do CLSI para tamanhos de halos de inibição, realizou-se uma comparação do halo obtido no estudo, em relação aos antibióticos utilizados para combater essa bactéria e observou-se uma considerável diferença entre eles. O estudo não representa condições reais, pois não foi possível comprovar se o seu mecanismo de ação inibiu completamente o crescimento da bactéria ou apenas reduziu. É possível que isso tenha ocorrido por conta de uma ou mais substâncias contidas no *kefir* fazendo com que potencializasse a sua ação antimicrobiana.

Palavra-chave: *kefir*, antimicrobiana; antibiograma.

ABSTRACT

In response to the growth of bacterial resistance to antimicrobials, the World Health Organization (2017) published its first list of antibiotic-resistant "priority pathogens" to guide and promote new research on antimicrobial substances. The kefir is a grain that after added to the milk, a fermentative process occurs, is a probiotic of great importance in the maintenance of health, composed by a group of bacteria and fungi that produce substances with antimicrobial activity. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of the kefir substrate against gram-positive, gram-negative and yeast-like fungi. In this research, 17 types of strains of bacteria and yeast fungi were used, performing the antibiogram by the disk-diffusion method of the CLSI, where only the bacterium *Pseudomonas aeruginosa* showed sensitivity with the formation of halos of sizes 45/40/32/25 mm. It is a gram-negative bacterium of great importance in immunocompromised individuals and one of the main agents in hospital infections in Brazil. From the CLSI standardization for inhibition halo sizes, a comparison of the halo obtained in the study with respect to the antibiotics used to combat this bacterium was made and a considerable difference was observed between them. The study does not represent real conditions, because it was not possible to verify if its mechanism of action completely inhibited the growth of the bacterium or only reduced it. It is possible that this happened due to one or more substances contained in the kefir causing it to potentiate its antimicrobial action.

Key words: kefir, antimicrobial; antibiogram.

1. INTRODUÇÃO

Em resposta ao crescimento da resistência bacteriana aos antimicrobianos, a Organização Mundial de Saúde (2017), publicou sua primeira lista de “agentes patogênicos prioritários” resistentes aos antibióticos. A lista foi elaborada numa tentativa de orientar e promover a Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) de novas substâncias antimicrobianas.

O *kefir* é um grão que após adicionado ao leite, ocorre um processo fermentativo, é composto por ácido, contém etanol, rico em proteína e baixa concentração de carboidrato, alta concentração de sais minerais e triptofano. É um alimento probiótico que favorece a saúde do intestino e do corpo. O processo fermentativo produz uma série de compostos que caracteriza o sabor e o aroma específico ao *kefir*, além de substâncias bioativas responsáveis pela prevenção de doenças (DIAS et al, 2016).

Segundo Francisco (2016), pesquisas demonstram que o consumo de grãos de *kefir* tem grande importância na manutenção da saúde, pois possuem funções antifúngicas, antibacterianas e antioxidantes.

As bactérias e os fungos presentes no *kefir* tem a capacidade de produzir várias substâncias antimicrobianas, como peróxido de hidrogênio, ácidos orgânicos, peptídeos, bacteriocinas, polissacarídeos, vitamina B12 e outras capazes de inibir o crescimento de patógenos. Possuem também atividades imunomoduladoras, anticarcinogênico, antitumoral, redução de efeitos de intolerância a lactose, balanço de microbiota intestinal entre outros (GARCIA, 2017).

A principal importância das substâncias antimicrobianas produzidas pelo *kefir* é ter como alternativa a vantagem de utilizar produtos naturais para tratamento de doenças causadas por bactérias resistentes, onde seria utilizada como reforço ou até mesmo substituição de antibióticos fortes, que causam danos à saúde de pacientes imunocomprometidos.

O aumento do consumo de antibióticos e com uso indiscriminado do mesmo, está ocorrendo uma resistência de algumas bactérias em relação a esses fármacos, tornando-se uma preocupação para saúde mundial (MARINO et al, 2016). De acordo com Moraes, Araújo e Braga (2016, p.128), um dos fatores do aumento dessa resistência é a prescrição médica sem um exame prévio e a automedicação.

A resistência bacteriana é ainda mais grave relacionada à pacientes internados em hospitais, onde há um grande índice de mortalidade causada por bactérias multirresistentes

(PERNA et al, 2015). Devido essa ocorrência, vários estudos buscam desenvolver compostos que possam ser uma alternativa terapêutica diferente da tradicional e o *kefir* tem sido uma proposta nova de antimicrobiano para bactérias gram-positivas, gram-negativas e até mesmo para fungos (DIAS et al, 2018).

Existem vários tipos de bactérias e fungos que causam danos à saúde humana. As bactérias são divididas em dois grandes grupos, Gram-positivas e as Gram-negativas. A parede celular das bactérias Gram-positivas é composta por uma camada espessa de peptidoglicano em volta da célula e também ácidos lipoteicóicos e polissacarídeos. As bactérias Gram-negativas possuem uma camada de peptidoglicano basal delgada e uma membrana externa constituída de lipoproteínas, fosfolipídios, proteínas e lipopolissacarídeo (VIEIRA, 2012).

Os fungos leveduriformes apresentam membrana celular bem definida, pouco espessa em células jovens e rígidas em células adultas. As leveduras não formam filamentos, são imóveis, quimio-heterotróficos e aeróbios facultativos. Sua reprodução pode ser assexuada e sexuada. São causadores de leveduroses, micoses superficiais que, geralmente são produzidas por espécies do gênero *Candida* (OLIVEIRA, 2014).

O presente estudo foi realizado com o intuito de avaliar a atividade antimicrobiana do substrato do *kefir* frente às bactérias gram-positivas, gram-negativas e fungos leveduriformes, utilizando a técnica de antibiograma para verificar o possível crescimento de halos.

2. METODOLOGIA

Trata-se de um estudo descritivo e qualitativo incluindo os estudos exploratórios, onde foi realizado a técnica de antibiograma com disco-difusão utilizando o substrato do *kefir*. Para alcançar os objetivos propostos neste estudo, foi utilizado artigos referentes ao tema como base teórica.

Origem das amostras

Foram utilizadas cepas de bactérias gram-positivas, gram-negativas e fungos leveduriformes doadas pelo Laboratório Carlos Chagas e os grãos de *kefir* foram obtidos por meio de doação.

Obtenção do Substrato do *Kefir*

Colocou-se leite pasteurizado em um frasco esterilizado, onde posteriormente os grãos de *kefir* foram adicionados e por um período de 20 horas ocorreu o processo de fermentação. Em seguida, a amostra foi submetida a uma peneiração com abertura de 0,5 mm para obtenção do substrato de *kefir*.

Sensibilidade *in vitro*

Foi realizado o inóculo das cepas de bactérias e fungos de acordo com o teste de sensibilidade aos antimicrobianos (Método de Disco-Difusão do CLSI) (COSTA, 2003). Utilizou-se discos de papel filtro esterilizados com diâmetro semelhante ao de antibiograma, imergiu-se os discos no substrato do *kefir* com auxílio de uma pinça estéril e fixou-se em placas de Petri com Ágar Mueller Hinton, previamente inoculadas com bactérias e fungos. Foram utilizadas 17 placas, onde em cada uma foi inserida quatro discos (em forma de quadrante) umedecidos com o substrato. Posteriormente, incubou-se em estufa à $35^{\circ}\text{C}\pm 2$ por um período de 24 e 48 horas. Observou-se se houve formação de halos nos dois períodos.

3. RESULTADOS

Das 17 amostras analisadas, observou-se que a cepa de *Pseudomonas aeruginosa* demonstrou sensibilidade ao substrato do kefir em relação as outras bactérias e fungos.

Quadro 1. Diâmetros dos halos de inibição pelo método de disco-difusão em bactérias gram-positivas, gram-negativas e fungos leveduriformes.

	Nomenclatura	Sensível	Resistente	Halo de inibição (mm)
BACTÉRIA GRAM POSITIVA	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	X	-
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	-	X	-
	<i>Enterococcus faecium</i>	-	X	-
	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	X	-
BACTÉRIA GRAM NEGATIVA	<i>Citrobacter diversus</i>	-	X	-
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	X	-
	<i>Escherichia coli</i>	-	X	-
	<i>Escherichia coli (ESBL+)</i>	-	X	-
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	X	-
	<i>Klebsiella pneumoniae (ESBL+)</i>	-	X	-
	<i>Proteus</i>	-	X	-
	<i>Proteus sp.</i>	-	X	-
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	X	-	45/40/32/25 mm
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-	X	-
FUNGOS LEVEDURIFOR- MES	<i>Candida albicans clara</i>	-	X	-
	<i>Candida albicans escura</i>	-	X	-
	<i>Candida parapsilosis</i>	-	X	-

Fonte: CONCEIÇÃO et al, 2018.

4. DISCUSSÃO

Em um estudo conduzido por Fijan (2015), avalia-se que a atividade oposta de um microrganismo contra outro pode ser causado por exclusão, modulação imunológica, ação de sistemas de defesa do hospedeiro, produção de ácidos orgânicos ou peróxido de hidrogênio que diminuem o pH, produção de antimicrobianos como bacteriocinas, antioxidantes, produção de moléculas sinalizadoras que desencadeiam mudanças no gene expressão etc.

Nesta pesquisa, confirmou-se a ocorrência da diminuição do potencial patogênico da *P. aeruginosa* frente ao substrato do *kefir*, considerando a formação de halos expressivos.

A *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria gram-negativa que causa enormes encargos para a saúde pública devido à sua capacidade de adaptar genoma e fisiologia durante infecções crônicas. Uma das suas principais características é ser um patógeno oportunista, principalmente em hospitais (FIJAN, 2015).

O substrato inibiu o potencial do patógeno, porém, os resultados indicaram que as propriedades antagonistas do probiótico não são universais para todos os outros microrganismos.

A inexistência da atividade antimicrobiana nos outros 16 microrganismos analisados, pode se dever por competição de nutrientes, por sítios de adesão e por modificação do metabolismo microbiano por meio da alteração da atividade enzimática (DIAS et al, 2016).

A partir da padronização do CLSI para tamanhos de halos de inibição, realizou-se uma comparação do halo obtido no estudo com o substrato do *kefir* em relação aos antibióticos utilizados para combater a *Pseudomonas aeruginosa*.

Quadro 2. Comparação de tamanho dos halos de inibição.

GRUPO	GERAÇÃO	ANTIMICROBIANO	TAMANHO DOS HALOS DE INIBIÇÃO (mm)	REFERÊNCIAS
Cefalosporina	3º	CEFTAZIDIMA	18 mm	CLSI
	4º	CEFEPIME	18 mm	
Quinolonas	2º	CIPROFLOXACINA	21 mm	
-	-	SUBSTRATO DO <i>KEFIR</i>	35 mm	CONCEIÇÃO et al, 2018

Fonte: CLSI, 2017 e CONCEIÇÃO et al, 2018.

O halo de inibição do substrato foi maior em relação aos antibióticos. É possível que isso tenha ocorrido por conta de uma ou mais substâncias contidas no *kefir* fazendo com que potencializasse a sua ação antimicrobiana.

5. CONCLUSÃO

As substâncias produzidas pelos microrganismos presente nos grãos de *kefir* são responsáveis pela sua ação antimicrobiana. O estudo revelou que o substrato do *kefir* possui essa ação contra cepas de *Pseudomona aeruginosa*, pois foi o único microrganismo que apresentou formação de halos, porém, não representa condições reais. Entretanto, nos outros microrganismos não ocorreu à mesma ação.

Nesta pesquisa, não foi possível comprovar se o mecanismo de ação antimicrobiana do *kefir* inibiu completamente o crescimento da bactéria ou apenas reduziu o seu crescimento. Para tais resultados seriam necessários estudos sobre os mecanismos exatos das interespecies a fim de obter essa resposta.

6. REFERÊNCIAS

- COSTA, Sílvia Figueireiro. **Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada – Oitava Edição**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicos/mae/manuais/clsi/clsi_OPASM2-A8.pdf> Acesso em: 29 set. 2018
- DA SILVA PERNA, Thaíssa Daulis Gonçalves et al. **Prevalência de infecção hospitalar pela bactéria do gênero klebsiella em uma Unidade de Terapia Intensiva**. Qualidade de vida e variáveis associadas ao envelhecimento patológico, v. 13, n. 2, p. 119-23, 2015. Disponível em: <<http://www.sbcm.org.br/revistas/RBCM/RBCM-2015-02.pdf#page=32>> Acesso em: 29 mai. 2018
- DIAS, Priscila Alves et al. Antimicrobial properties of kefir. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 83, 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S180816572016000100403> Acesso em: 01 abr. 2018
- DIAS, Priscila Alves; SILVA, Daiani Teixeira; TIMM, Cláudio Dias. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE MICROORGANISMOS ISOLADOS DE GRÃOS DE KEFIR. **Ciência Animal Brasileira**, v. 19, n. 1, p. 1-8, 2018. Disponível em: <<https://www.revistas.ufg.br/vet/article/view/e-40548/25394>> Acesso em: 10 set. 2018
- FIJAN, S. Influence of the growth of *Pseudomonas aeruginosa* in milk fermented by multispecies probiotics and Kefir microbiota. **J Probiotics Health**, v. 3, p. 136, 2016. Disponível em: <<https://www.omicsonline.org/open-access/influence-of-the-growth-of-pseudomonas-aeruginosa-in-milk-fermented-by-multispecies-probiotics-and-kefir-microbiota-2329-8901-1000136.pdf>> Acesso em: 10 out. 2018
- GARCIA, Luciane Vieira et al. AVALIAÇÃO DA ACEITABILIDADE DE PREPARAÇÕES DO ALIMENTO PROBIÓTICO KEFIR. **Revista Ciência e Saúde Online**, v. 2, n. 1, 2017. Disponível em: <<http://revistaeletronicafunvic.org/index.php/c14ffd10/article/view/71/56>> Acesso em: 01 mai. 2018
- MARINHO, H.R.P.; PERONICO, U.L.O; KOCERGINSKY. **Bacterial Resistance: A Literature Review**. João Pessoa, v. 16 nº 4 p.124-126, 2016
- MORAES, Amanda Ludogério; ARAÚJO, Nayara Gabriele Picanço; BRAGA, Tatiana de Lima. Automedicação: revisando a literatura sobre a resistência bacteriana aos antibióticos. **Revista Eletrônica Estácio Saúde**, v. 5, n. 1, p. 122-132, 2016. Disponível em: <<http://revistaadmmade.estacio.br/index.php/saudesantacatarina/article/viewFile/2234/1059>> Acesso em: 01 mai. 2018
- OLIVEIRA, Jeferson Carvalhaes de. **Tópicos em Micologia Médica** / Jeferson Carvalhaes de Oliveira – Rio de Janeiro; 2014. 230. Disponível em: <http://www.iqg.com.br/uploads/biblioteca/topicos_micologia_3ed.pdf> Acesso em: 29 ago. 2018

OMS publica lista de bactérias para as quais se necessitam novos antibióticos urgentemente. **Organização Mundial de Saúde**: Brasília, DF, 2017. Disponível em: < www.paho.org> Acesso em: 16 ago. 2018

PALEZI, Simone Canabarro; DE MARCHI, Luana; PIETTA, Giordana Maria. Caracterização e avaliação sensorial do kefir tradicional e derivados. **Unoesc & Ciência-ACET**, p. 15-22, 2015

SANTOS, Ferlando Lima et al. KEFIR: UMA NOVA FONTE ALIMENTAR FUNCIONAL?. **Diálogos & Ciência**. Online. v. 27, 2012. Disponível em: < <http://www.dialogos.ftc.br/>> Acesso em: 29 ago 2018

VIEIRA, Darlene Ana de Paula. **Microbiologia Geral** / Darlene Ana de Paula Veira, Nayara Cláudia de Assunção Queiroz. – – Inhumas: IFG; Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2012. 100 p. Disponível em: <http://estudio01.proj.ufsm.br/cadernos/ifgo/tecnico_acucar_alcool/microbiologia_geral.pdf> Acesso em: 29 ago. 2018.