

VANIKY DUARTE MARQUES

Avaliação da atividade antimicrobiana do kefir do leite

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo

2020

VANIKY DUARTE MARQUES

Avaliação da atividade antimicrobiana do kefir do leite

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Profa. Dra. Soraia Attie Calil Jorge

Coorientador: Profa. Dra. Marta Domingos

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca no ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

**São Paulo
2020**

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Duarte Marques , Vaniky

Avaliação da atividade antimicrobiana do kefir do leite / Vaniky Duarte Marques ; orientadora Soraia Attie Calil Jorge; coorientadora Marta Domingos. -- São Paulo, 2020.

79 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Soro de kefir. 2. Microbiologia aplicada. 3. leite fermentado. 4. leite de kefir. 5. simbiose microbiana. I. Attie Calil Jorge, Soraia , orientador. II. Domingos, Marta, coorientador. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): **Vaniky Duarte Marques**

Título da Dissertação: **Avaliação da atividade antimicrobiana do kefir do leite**

Orientador: **Profa. Dra. Soraia Attie Calil Jorge**

Coorientador: **Profa. Dra. Marta Domingos**

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

Aprovado(a) **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente: Assinatura:

Nome:

Instituição:

São Paulo, 19 de novembro de 2019

CEUAx N 7589180619

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Marta De Oliveira Domingos

Área: Bacteriologia

Equipe envolvida: Vaniky Duarte Marques - *executor* (Instituto Butantan); Soraia Attie Calil Jorge (orientador)

Título do projeto: "Caracterização da fração antimicrobiana FK-1000".

Parecer Consubstanciado da CEUA IB

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan, na reunião de 21/08/2019, **ANALISOU** e **APROVOU** o protocolo de estudo acima referenciado. A partir desta data, é dever do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.



Maria Leonor Sarno de Oliveira
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan



Nancy Oguiura
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

São Paulo, 19th November 2019

CERTIFIED

We certify that the Research "Characterization of the FK-1000 antimicrobial fraction", protocol number CEUAX 7589180619, under the responsibility Marta De Oliveira Domingos, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of Butantan Institute, and was approved in the meeting of day August 21, 2019.

Certificamos que o protocolo do Projeto de Pesquisa intitulado "Caracterização da fração antimicrobiana FK-1000", protocolado sob o CEUAX nº 7589180619, sob a responsabilidade de Marta De Oliveira Domingos, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan, e foi aprovado na reunião de 21 de agosto de 2019.



Maria Leonor Sarno de Oliveira
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan



Nancy Oguiura
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

*À minha família, Jader, Célia e Thuanny
por todo incentivo desde sempre;
À todos parentes, familiares e amigos por
acreditarem em mim;
À memória de meu avô, José Jaime
Duarte.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo e ao Instituto Butantan por me permitir fazer parte do seu Programa de Pós-Graduação.

À Comissão da Pós-Graduação e Secretaria da Biotecnologia por toda atenção, auxílio e dúvidas esclarecidas.

Ao Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, em nome de seu diretor, **Dr. Waldir Pereira Elias Júnior**.

À **Dra. Soraia Attie Calil Jorge**, orientadora deste trabalho, pela confiança, presença, disponibilidade, boa vontade, ajuda e profissionalismo que foram essenciais e indispensáveis para a finalização deste Projeto de Mestrado.

À **Dra. Marta de Oliveira Domingos**, coorientadora deste trabalho, por me permitir ser orientada durante 5 anos ao seu lado, pelo conhecimento repassado, por me proporcionar fazer parte de uma linha de pesquisa tão importante e com tantas perspectivas futuras. Seu trabalho, sua companhia, ajuda, confiança, ensinamentos, profissionalismo, empatia, respeito e principalmente amizade, foram de suma importância e contribuíram de fato para minha construção como pessoa e futura Mestre em Biotecnologia.

À todos os funcionários, pesquisadores e alunos do Laboratório de Bacteriologia, principalmente **Dra. Roxane Maria Fontes Piazza, Dra. Márcia Regina Franzolin, Dra. Rita de Cássia Ruiz e Dra. Monamaris Marques Borges** por todo auxílio desde equipamentos até sugestões que contribuíram em meu trabalho.

À todos meus companheiros de Laboratório, **Thiago Jordão, João Bezerra e Geovanna Anjos** que sempre me auxiliaram, trocaram ensinamentos e fizeram parte deste projeto durante os 5 anos que estive presente.

Em especial **Irys Viana Neves e Herbert Silva**, meus amigos de laboratório mais próximos, pela amizade inestimável, paciência, carinho, ajuda, reflexões e bom humor, e principalmente por me ensinarem o valor de uma amizade, e o quanto precisamos um dos outros. Serão inesquecíveis.

Aos companheiros do Laboratório de Bacteriologia, **Juliana Polato, Miriam Aparecida da Silva, Suzanna de Souza** e aos alunos da Dra. Roxanne Piazza e Dra. Monamaris Borges pela ajuda oferecida sempre que precisei.

À **Suzi Alcantara**, por ser uma profissional exemplar e uma amiga que levarei para sempre em meu coração.

Aos **Me. Paulo Vieira e Me. Abraham Culupu**, companheiros do laboratório, sempre preocupados em me ajudar e repassar seus conhecimentos e experiências, auxiliando na prática e na teoria para que esse Trabalho tivesse seu melhor proveito.

Aos companheiros de Pós Graduação, pela amizade, por saber me ouvir e me ajudar nos momentos que precisei, em especial **Me. Adriana Sanches**.

Ao Laboratório de Bioquímica do Instituto Butantan, em especial **Dr. Daniel Carvalho Pimenta e Dr. Hugo Vigerelli**; Laboratório de Biofísica da UFRJ, em especial **Dra. Lucia Mendonça Previato e Dr. José Osvaldo Previato**; Laboratório de Investigação Médica em Dermatologia e Imunodeficiência do IMT/SP, em especial **Dr. Sabri Sanabani**. Todos contribuíram na realização de metodologias que engrandeceram meu trabalho.

Aos meus grandes amigos da Graduação, **Fernando Ramon Zilinski, Priscila Tempaku e Camila Cruz**, por me darem forças a cada dificuldade, ao me ajudarem da melhor forma que pudessem, pelas palavras de incentivo e por acreditarem em mim.

Aos meus pais, **Célia e Jader**, e irmã, **Thuanny**, pela compreensão, investimento, incentivo, ajuda, paciência, confiança, credibilidade e que me ensinaram a nunca desistir dos meus objetivos, fazendo-os se orgulharem de tudo que sou e me tornei.

À todos amigos e familiares por serem meu refúgio e grandes incentivadores nos momento de dificuldades.

À Agência de incentivo a pesquisa, **CNPQ**, “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil” (134049/2017-9) pelo apoio.

“A maior glória em viver não é nunca cair, mas sempre se levantar toda vez que caímos” – Nelson Mandela

RESUMO

MARQUES, V. D. **Avaliação da atividade antimicrobiana do kefir do leite**, 2020. 78f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

O kefir tradicional é uma bebida derivada da fermentação do leite por uma associação simbiótica de bactérias e leveduras que se abrigam em uma estrutura em forma de grão. Estudos têm atribuído ao kefir propriedades antitumorais e antimicrobianas. No presente trabalho, investigamos a atividade antimicrobiana de duas amostras de kefir produzidas por grãos de diferentes origens. Para isso, o kefir foi separado por centrifugação em dois componentes, soro e leban e as atividades antimicrobianas foram determinadas utilizando o soro. A atividade antimicrobiana foi avaliada segundo a capacidade das duas amostras de soro de kefir de inibir a proliferação e a formação de unidades formadoras de colônia (UFC) dos seguintes patógenos: *Staphylococcus aureus* ATCC 2593, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Os resultados mostraram que apenas uma das amostras de soro mostrou atividade antimicrobiana contra esses patógenos. A análise do gene 16S rRNA das bactérias presentes nas duas amostras de grãos, mostrou que a microbiota bacteriana dos grãos que produziram kefir com atividade antimicrobiana contra os patógenos testados é diferente da dos grãos que produziram kefir sem essa atividade. Os resultados também mostraram que a atividade antimicrobiana do soro de kefir é bactericida para *S. aureus*, MRSA e *P. aeruginosa* em pH 5. Todavia, em pH 7 mostrou efeito bactericida apenas contra *S. aureus* e MRSA, sendo bacteriostático contra *P. aeruginosa*. O soro de kefir foi então separado por centrifugação com Centricon YM-10 de membrana de 10 kDa ou por diálise contra água destilada em tubos de membrana de poros de 1 kDa em várias frações moleculares. O perfil molecular das frações foi analisado por eletroforese em Tris-Tricina em gel de 10% e 16%. A atividade bacteriostática e bactericida de cada fração foi testada em pH 5 e pH 7. Os resultados mostraram que as moléculas com atividade antimicrobiana do soro de kefir possuem massa menor do que 10 kDa e podem ser divididas em dois grupos, um com massa molecular entre 1 e 10 kDa e outro com massa menor que 1 kDa. O grupo com massa entre 1 e 10 kDa mostrou apenas efeito bacteriostático contra

todos os patógenos testados tanto em pH 5 quanto em pH7. Por outro lado, o grupo com massa menor do que 1 kDa apresentou efeito bactericida contra MRSA numa concentração igual ou maior que 15,6 mg/mL e contra *P. aeruginosa* numa concentração igual ou maior que 31,2 mg/mL. Todavia, em pH 7, essa fração mostrou apenas efeito bacteriostático contra esses patógenos. A análise dessa fração por espectrometria de massa mostrou que as moléculas presentes nessa fração possuem massa entre 91 e 400 Daltons. Em resumo, os resultados obtidos nesse estudo mostram que a atividade antimicrobiana do soro de kefir contra *S. aureus*, MRSA e *P. aeruginosa* está relacionada com a origem dos grãos, é pH dependente e está associada a moléculas de massa inferior a 10 kDa.

Palavras-chave: Soro de Kefir. Microbiologia aplicada. Leite de Kefir. Simbiose microbiana. Probióticos.

ABSTRACT

MARQUES, V. D. Evaluation of antimicrobial activity of milk kefir. 2020. 78f. Dissertation (Master Degree in Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Traditional kefir is a beverage derived from the fermentation of milk by an association of bacteria and yeast that live in symbiosis in an structure in the form of grain. Several studies have attributed to kefir antitumor and antimicrobial activities. In the present study, we investigated the antimicrobial activity of two kefir samples produced by grains of different origins. Accordingly, kefir was separated by centrifugation into two components, serum and leban. Antimicrobial activities were determined using only kefir serum. The antimicrobial activity was determined according to the ability of two kefir serum samples to inhibit the proliferation and the number of colony-forming units (CFUs) of the following pathogens: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Staphylococcus aureus* ATCC 2593 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. The results showed that only one of the two serum samples tested showed antimicrobial activity against these pathogens. Analysis of the 16S rRNA gene of the bacteria present in both grain samples showed that their microbiota are different from each other. The results also showed that the antimicrobial activity of the kefir serum is bactericidal for *S. aureus*, MRSA and *P. aeruginosa* at pH 5, but at pH 7 showed bactericidal effect only against *S. aureus* and MRSA, having only bacteriostatic effect against *P. aeruginosa* at this pH. The kefir serum was then separated either by centrifugation with 10 kDa Centricon device or by dialysis against distilled water in membrane tubes of 1 kDa pore in different molecular fractions. The molecular profile of the fractions was analyzed by 10% and 16 % Tris-Tricine gel electrophoresis. The bacteriostatic and bactericidal activity of each fraction was tested at pH 5 and pH 7. The results showed that the molecules of the kefir serum with antimicrobial activity have mass lower than 10 kDa and can be divided into two groups, one with molecular mass between 1 and 10 kDa and another with mass lower than 1 kDa. The group with mass between 1 and 10 kDa showed at pH 5 and 7, only bacteriostatic effect against all pathogens tested. On the other hand, the group with mass lower than 1 kDa at pH 5, was bactericidal against MRSA and *P. aeruginosa* up to 15,6 mg/mL and against *S aureus* up to 31,2 mg/mL.

However, at pH 7 this molecular fraction showed only bacteriostatic effect against these pathogens. The fraction with mass below 1 kDa was also analyzed by mass spectrometry and the results showed that the mass of the molecules present in this fraction ranged between 91 and 400 Daltons. In summary, the results show that the antimicrobial activity of kefir against *S. aureus*, MRSA and *P. aeruginosa* is related to the origin of the grains, it is pH dependent and associated to molecules with mass lower than 10 kDa.

Keywords: Kefir serum. Applied microbiology. Kefir milk. Microbial symbiosis. Probiotics

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Grãos de Kefir	18
Figura 2- Estrutura Química do polissacarídeo Kefiran.....	21
Figura 3- Microscopia eletrônica de grãos de kefir do leite em diferentes ciclos de fermentação.....	23
Figura 4- Kefir do leite.....	25
Figura 5- Kefir do leite separado em soro e leban por centrifugação.....	26
Figura 6- Identificação Bioquímica de <i>S. aureus</i>	40
Figura 7 - Determinação de resistência à meticilina das cepas de <i>S aureus</i>	41
Figura 8- Atividade antimicrobiana de duas amostras diferentes de soro de kefir em pH5.....	44
Figura 9- Famílias e filos das bactérias presentes nos grãos de kefir do leite, com atividade antimicrobiana (Grão de kefir do Leite 1) e sem atividade antimicrobiana (Grão de Kefir do Leite 2).....	46
Figura 10- Atividade antimicrobiana do Soro de Kefir 1 em ph 7.....	48
Figura 11 - Caracterização molecular do soro de Kefir.....	50
Figura 12 – Espectrometria de massa da fração Molecular de massa abaixo de 1 kDa.....	50
Figura 13- Atividade antimicrobiana das frações do soro de massa acima e abaixo de 10 kDa em pH 5.....	51
Figura 14- Atividade Antimicrobiana da Fração Molecular entre 1 kDa e 10 kDa em ph 5 e 7.....	53
Figura 15- Atividade Antimicrobiana da Fração Molecular Abaixo de 1 kDa em ph 5 e 7.....	54
Figura 16- Concentração inibitória mínima da fração molecular do soro de kefir com massa menor do que 1 kDa em pH 5.....	55
Figura 17- Concentração inibitória mínima da fração molecular do soro de kefir com massa menor do que 1 kDa em pH 7.....	56

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

µg - Micrograma

µL - Microlitros

µm - Micrometros

Anvisa – “Agência Nacional de Vigilância Sanitária”

BAA - Bactéria ácido acética

BAL- Bactéria ácido láctica

CIM - Concentração inibitória mínima

CLSI - “*The Clinical and Laboratory Standards Institute*”

CO₂ - Dióxido de carbono

Da- Dalton

DMEM - Dulbecco's Modified Medium

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DO - Densidade óptica

FAO - Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura

INTERMED - intermediário

kDa - Quilodaltons

kV - Quilovolts

m/z - Massa sobre carga

MH - Mueller Hinton

MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina.

OMS - Organização Mundial da Saúde

PBS - Tampão fosfato salino

PCR - Reação em cadeia da polimerase

RNAr- Ácido ribonucleico ribossomal

S. aureus - *Staphylococcus aureus*

P. aeruginosa - *Pseudomonas aeruginosa*

ATCC - American Type Culture Collection

SDD - Suscetível/ dose dependentes

NU - Não utilizado

TSA - Ágar com tripticaseína de soja

TSB - Tripticaseína de soja

UFC - Unidades formadoras de colônia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 <i>Grãos de kefir do leite</i>	20
2.1.1 Origem dos grãos	20
2.1.2 Manutenção e composição dos grãos	20
2.1.3 - Estrutura dos Grãos	20
2.1.4 Composição microbiológica dos grãos	21
2.1.5 Espécies de microrganismos frequentemente isoladas nos grãos de kefir. ...	23
2.2 <i>Produção de kefir do leite</i>	24
2.3 <i>Ação probiótica do Kefir</i>	26
2.4 <i>Atividade antimicrobiana do kefir</i>	27
3 OBJETIVOS	29
4 MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 <i>Cepas bacterianas</i>	30
4.1.1 Isolamento e identificação da cepa bacteriana isolada de uma cultura de DMEM.	30
4.1.2 Determinação de resistência das amostras de S.aureus a metilina/oxacilina	31
4.1.3 Antibiograma	32
4.2 <i>Grãos de kefir: origem e microbiota</i>	34
4.3 <i>Obtenção de kefir</i>	35
4.4 <i>Obtenção do soro de kefir</i>	35
4.5 <i>Fracionamento e caracterização do soro de kefir</i>	36
4.5.1 Separação do soro de kefir em frações moleculares	36
4.5.2 SDS-PAGE Tris-tricina	37
4.5.3 Espectrometria de Massa	37
4.6 <i>Proliferação bacteriana</i>	38
4.7 <i>Contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC)</i>	38
4.8 <i>Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) da fração do kefir com massa abaixo de 1 kDa</i>	39
4.9 <i>Análise estatística</i>	39
5 RESULTADOS	40
5.1 <i>Identificação da Cepa bacteriana isolada no meio de cultura DMEM e caracterização da resistência a antibióticos</i>	40

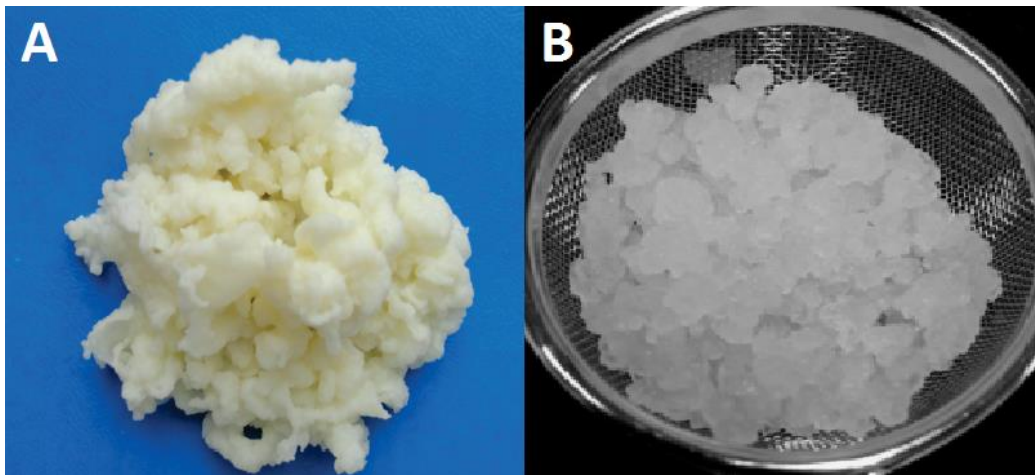
5.2 Ação antimicrobiana do soro de kefir em pH 5 produzido por duas amostras de grãos de kefir do leite	42
5.3 Microbiota dos grãos de kefir (1 e 2)	45
5.4 Ação antimicrobiana do soro de kefir em pH 7.....	47
5.5 Caracterização molecular do soro de kefir	48
5.6 Efeito antimicrobiano das frações moleculares do soro de kefir.....	51
5.7 Concentração inibitória mínima da Fração molecular de massa menor que 1 kDa	54
6 DISCUSSÃO	57
7 CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS.....	65
APÊNDICE A- SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S RNAR	73
APENDICE B -ARTIGO CIENTÍFICO PUBLICADO.....	77

1 INTRODUÇÃO

Kefir é uma bebida originalmente derivada da fermentação do leite ou do açúcar mascavo por uma associação simbiótica de bactérias e leveduras, que se abrigam em uma estrutura de polissacarídeos em forma de grãos (NIELSEN; GÜRAKAN; ÜNLÜ, 2014; LIMA et al., 2017). O termo “grãos de kefir” muito utilizado na literatura se refere ao conjunto formado pela matriz estrutural dos grãos e pelos microrganismos associados a ela (HAMET et al., 2013; NIELSEN; GÜRAKAN; ÜNLÜ, 2014; CHEIRSILP et al., 2017). Existem dois tipos de grãos de kefir, um denominado grãos de kefir do leite e outro denominado grãos de kefir da água ou Tibicos (SHARIFI et al., 2017).

Quanto ao aspecto, tanto os grãos de kefir do leite quanto os grãos de kefir da água possuem forma irregular de consistência gelatinosa cujo tamanho varia de milímetros a centímetros. Os grãos de kefir do leite podem ser brancos ou amarelo claros, enquanto os grãos de kefir da água são translúcidos ou caramelo (Figura 1) (HAMET et al., 2013; NIELSEN; GÜRAKAN; ÜNLÜ, 2014).

Figura 1- Grãos de Kefir



A: Grãos de kefir do leite. B: Grãos de Kefir da água. Fonte: adaptado de Leite et al. (2012b) e Laureys et al. (2017).

A origem e a composição microbiológica dos grãos de kefir da água e do leite são diferentes. A origem dos grãos de kefir da água é controversa e permanece indefinida. Alguns relatos indicam que os grãos de kefir da água foram introduzidos na Europa por soldados ingleses em 1855 depois da guerra da Crimeia, enquanto

outros sugerem que eles se originaram no México oriundos de um cacto (*Optunia*) (GULITZ et al., 2011).

A manutenção e a proliferação dos grãos de kefir da água são realizadas através da incubação dos grãos em água mineral tendo o açúcar mascavo como principal fonte de alimento e, opcionalmente, frutas secas (GULITZ et al., 2011; LAUREYS; VUYST, 2017). Hoje em dia, esses grãos também são utilizados para fermentar outros substratos como: sucos de fruta e água de coco e até mesmo leite (CORONA et al., 2016; RANDAZZO et al., 2016).

Apesar dos grãos de kefir da água serem similares aos grãos de kefir do leite, eles são culturas distintas que não se propagam uma através da outra.

Neste estudo utilizamos o kefir originado da fermentação de duas amostras diferentes de grãos de kefir do leite, para avaliar a capacidade antimicrobiana deste composto em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Grãos de kefir do leite

2.1.1 Origem dos grãos

A palavra kefir é originária do eslavo Keif que significa "bem-estar" ou "bem-viver" (ZUBILLAGA, M, 2001). Acredita-se que os grãos de kefir do leite tiveram origem entre as tribos mulçumanas das montanhas do Cáucaso há milhares de anos (NIELSEN; GÜRAKAN; ÜNLÜ, 2014). Conta à lenda que os grãos de Kefir foram um presente de Alá ao profeta Maomé para garantir longevidade ao homem. O profeta Maomé, por sua vez, passou os grãos de Kefir aos aldeões, instruindo-os para que mantivessem a produção em segredo, pois sua divulgação faria com que os grãos perdessem a sua força. A produção de Kefir e seus grãos foram então passados em segredo de geração em geração entre os aldeões pastores das montanhas do Cáucaso. Apenas no início do século XX, o kefir foi introduzido através da Rússia a outros países. Atualmente os grãos de Kefir do leite são adquiridos comercialmente ou por doações de pessoas que cultivam os grãos para consumo próprio (LOPITZ-OTSOA et al., 2006; NIELSEN; GÜRAKAN; ÜNLÜ, 2014; LIMA et al., 2017).

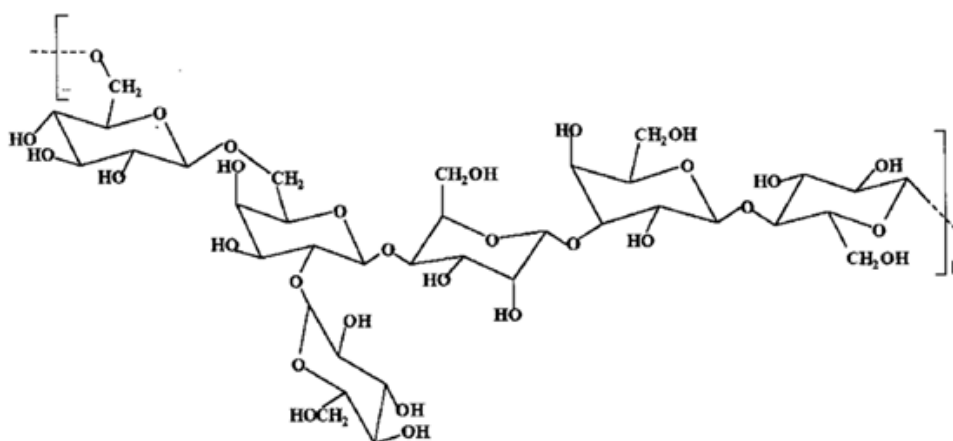
2.1.2 Manutenção e composição dos grãos

A manutenção e a propagação dos grãos de kefir do leite são realizadas através do cultivo dos grãos em leite. Quando bem preservados em leite e temperatura constante, os grãos podem manter sua atividade durante anos. Todavia, estudos têm indicado que os grãos também podem ser congelados e liofilizados, no entanto, nessas condições o crescimento dos grãos e suas propriedades biológicas podem ser afetados (LEITE et al., 2012b; NIELSEN; GÜRAKAN; ÜNLÜ, 2014).

2.1.3 - Estrutura dos Grãos

De acordo com Rosa et al. (2017), os grãos revelam uma estrutura complexa formada por 4,4% de lipídeos, 45,7% de mucopolissacarídeos, 34,3% de proteínas totais, vitamina do complexo B, vitamina K, triptofano, cálcio, fósforo e magnésio, além de bactérias e leveduras. O microbioma do kefir é mantido junto ao kefiran, que é a matriz estrutural dos grãos composta por unidades de D-glicose e D-galactose (Figura 2). O kefiran é insolúvel em água. Os microrganismos responsáveis pela sua produção são os *Lactobacillus kefiranofaciens* ou *Lactobacillus kefiri* (HAMET et al., 2013; NIELSEN; GÜRAKAN; ÜNLÜ, 2014; CHEIRSILP et al., 2017; ROSA et al., 2017).

Figura 2- Estrutura Química do polissacarídeo Kefiran



Fonte: Micheli et al. (1999).

Estudos demonstraram que a presença do kefiran é essencial para a propagação dos grãos e do microbioma que eles abrigam (HAMET et al., 2013; NIELSEN; GÜRAKAN; ÜNLÜ, 2014). Além disso, existem trabalhos que mostram que o kefiran possui atividade antibacteriana e é capaz de modular o sistema imunológico do intestino contra infecções (ZUBILLAGA et al., 2001; RODRIGUES et al., 2005; BOURRIE, WILLING E COTTER, 2016; LIMA et al., 2017).

2.1.4 Composição microbiológica dos grãos

Em geral, os grãos de Kefir do leite são compostos por bactérias ácido lácticas (BAL), bactérias ácido acéticas (BAA) e leveduras (MAGALHÃES et al., 2011; RATTRAY; O'CONNEL, 2011; LEITE et al., 2012b) que formam um dos principais

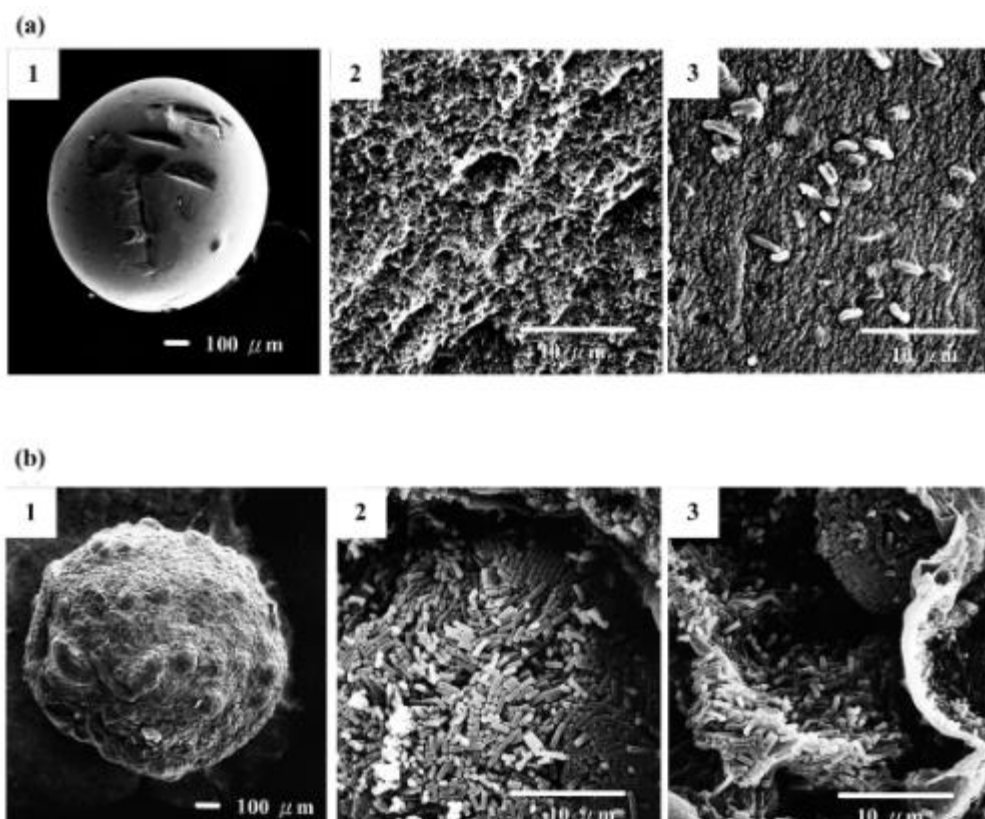
exemplos de comunidade simbiótica (LOPITZ-OTSOA et al., 2006). Justamente por terem evoluído em simbiose, as bactérias e leveduras do kefir quando separadas como cultura pura, ou não crescem ou apresentam uma diminuição do metabolismo. Isso pode ser explicado em parte pelo fato das leveduras serem responsáveis por fornecer nutrientes essenciais de crescimento como aminoácidos e vitaminas, alterarem o pH, secretarem etanol, produzirem CO₂ e também contribuem para o aroma e sabor do kefir. Dessa maneira as leveduras fornecem um ambiente favorável para o crescimento das bactérias presentes nos grãos (FARNWORTH; MAINVILLE, 2008; LEITE et al., 2012b).

Em geral, o número de bactérias ácido lácticas nos grãos de kefir varia entre 10⁸ e 10⁹ UFC/mL (Unidades Formadoras de Colônia/mL). Esse número é maior que o número de bactérias ácido acéticas e leveduras presentes nos grãos que é cerca de 10⁵ e 10⁶ UFC/mL para ambos microrganismos (GUZEL-SEYDIM et al., 2005; LEITE et al., 2013).

Todavia, a composição microbiológica dos grãos de kefir do leite ainda é controversa e depende fortemente da origem dos grãos, das técnicas utilizadas na manipulação dos mesmos, do ambiente, da temperatura, do tempo, dos ciclos de fermentação e do substrato utilizado para proliferação dos grãos (WITTHUHN; SCHOEMAN; BRITZ, 2004; WESCHENFELDER; WIEST; CARVALHO, 2009; HAMET et al., 2013; NIELSEN; GÜRAKAN; ÜNLÜ, 2014, LEITE et al., 2013; GUZEL-SEYDIM et al., 2005).

Um bom exemplo de como a quantidade e posicionamento dos microrganismos nos grãos pode variar entre os diferentes ciclos de fermentação foi demonstrado no estudo realizado por Chen e colaboradores (2009). Esses autores mostraram que após 28 dias de fermentação a superfície dos grãos se torna mais porosa e a densidade de lactobacilos na superfície e no núcleo dos grãos também é aumentada (Figura 3).

Figura 3- Microscopia eletrônica de grãos de kefir do leite em diferentes ciclos de fermentação.



Fonte: Chen et al. (2009). Microscopia eletrônica evidenciando o efeito no número de ciclos de fermentação nas BAL presentes no grão de kefir: A1- microscopia de toda superfície do grão no primeiro dia de fermentação. A2- microscopia de uma parte da superfície do grão no primeiro dia de fermentação. A3- microscopia da seção transversal do grão no primeiro dia de fermentação. B1- microscopia de toda superfície do grão após o 28º dia de fermentação. B2- microscopia de uma parte da superfície do grão após o 28º dia de fermentação. B3- microscopia da seção transversal do grão após o 28º dia de fermentação.

2.1.5 Espécies de microrganismos frequentemente isoladas nos grãos de kefir.

Apesar da grande diversidade encontrada entre o microbioma dos grãos de kefir de diferentes origens, alguns microrganismos são isolados com mais frequência. Quanto às bactérias, as mais isoladas nos grãos de kefir do leite são: *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus kefirgranum*, *Lactobacillus parakefir*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus* spp., *Streptococcus thermophilus*, *Leuconostoc*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp.

cremoris e *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (LEITE et al., 2012a; LEITE et al., 2012b).

As principais leveduras encontradas nos grãos de kefir do leite capazes de fermentar a lactose geralmente incluem *Kluyveromyces marxianus*, *Candida kefyr*, *Kluyveromyces lactis* var. *lactis*, *Debaryomyces hansenii* e *Dekkera anomala*, enquanto as que não fermentam lactose incluem *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii*, *Pichia fermentans*, *Kazachstania unispora*, *Saccharomyces turicensis*, *Issatchenkia orientalis* e *Debaryomyces occidentalis* (LEITE et al., 2012b).

2.2 Produção de kefir do leite

O kefir como bebida fermentada é obtido através da fermentação do leite pelos grãos, portanto, enquanto se propagam, os grãos fermentam o leite e produzem kefir. O kefir derivado da fermentação do leite pelos grãos de kefir do leite é denominado de kefir autêntico, tradicional ou kefir real (NIELSEN; GÜRAKAN; ÜNLÜ, 2014; LIMA et al., 2017).

Em resumo, o Kefir Tradicional é produzido pela adição dos grãos de kefir ao leite fresco, que é fermentado até atingir uma consistência cremosa, homogênea, viscosa, ligeiramente efervescente e levemente alcoólica semelhante ao iogurte. Ele é facilmente digerido e uma ótima fonte de alimento probiótico (Figura 4) (NIELSEN; GÜRAKAN; ÜNLÜ, 2014; LIMA et al., 2017).

Figura 4- Kefir do leite

Fonte: Elaborada pelo próprio autor, 2019.

O kefir Tradicional pode ser produzido utilizando diferentes tipos de leite: leite de vaca (o mais comum), cabra ou de ovelha. Ele também pode ser preparado utilizando leites vegetais, como leite de noz, de soja, de coco, de arroz e de amendoim, porém, após alguns ciclos de fermentação, podem haver alterações e perda de algumas propriedades dos grãos de kefir (NIELSEN; GÜRAKAN; ÜNLÜ, 2014; LIMA et al., 2017).

Devido à fermentação realizada pelas bactérias e leveduras dos grãos, o kefir é rico em ácido láctico, etanol e CO_2 , o que confere a ele viscosidade, acidez e baixo teor de álcool. Outros produtos como ácido acético, ácido glicônico, diacetil, acetaldeído, aminoácidos, vitamina B12 e polissacarídeos também são encontrados no kefir (HERTZLER; CLANCY, 2003; LEITE et al., 2012b).

De acordo com Weschenfelder, Wiest e Carvalho (2009) a partir da filtração ou centrifugação o kefir é separado em dois componentes: leban e soro (Figura 5).

Figura 5 – Kefir do leite separado em soro e leban por centrifugação.



Fonte: Elaborada pelo autor (2018).

O leban é a fase sólida do kefir, que é leve e altamente digerível, com sabor e textura semelhantes ao queijo do tipo cottage, podendo ser consumido puro ou em formulações substituindo o *cream cheese*, requeijão, iogurte e creme de leite. O soro consiste na fase líquida podendo ser aproveitado pela indústria alimentícia de diversas maneiras como matéria prima para a elaboração de produtos e bebidas lácteas (WESCHENFELDER; WIEST; CARVALHO, 2009).

2.3 Ação probiótica do Kefir

De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) e com a Organização Mundial da Saúde (OMS) probióticos são microrganismos vivos que, quando consumidos em uma quantidade adequada conferem benefício à saúde humana (MORELLI; CAPURSO, 2012).

Os probióticos atuam de duas maneiras: através do efeito direto dos microrganismos no organismo ou através dos metabólitos produzidos por eles, denominados de produtos biogênicos. Portanto, produtos biogênicos são definidos como componentes derivados da atividade de microrganismos probióticos que desencadeiam benefícios à saúde (TAKANO, 2002).

Vários estudos demonstraram que o kefir confere benefícios a saúde, sendo considerado, portanto, um produto probiótico (NIELSEN; GÜRAKAN; ÜNLÜ, 2014; LIMA et al., 2017). Como probiótico, o kefir pode agir através dos produtos biogênicos derivados do metabolismo dos diversos microrganismos presentes nos grãos ou pelo efeito direto das bactérias presentes no kefir e/ou nos grãos quando consumidos como alimento.

Sendo assim, foram descritos diversos efeitos benéficos do kefir para a saúde humana como, por exemplo: alívio de alergias, remissão de câncer, proteção contra úlcera no estômago, erradicação de *Helicobacter pylori*, aumento da imunidade intestinal, melhora do sistema circulatório e do metabolismo do colesterol, equilíbrio do microbioma intestinal e atividade antioxidante (ZUBILLAGA et al., 2001; RODRIGUES et al., 2005; BOURRIE, WILLING E COTTER, 2016; LIMA et al., 2017; KIM et al., 2018).

2.4 Atividade antimicrobiana do kefir

Vários estudos mostraram que o kefir possui atividade antimicrobiana evidenciada contra vários patógenos como: *Bacillus cereus*, *S. aureus*, *Escherichia.coli*, *Salmonella spp.*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Helicobacter pylori* entre outros (CEVIKBAS et al., 1994, GARROTE et al., 2000; SANTOS et al., 2003; CARVALHO 2004; RODRIGUES et al., 2005; ULUSOY et al., 2007; SILVA et al., 2009; ISMAIEI et al., 2011; LONDERO et al., 2011; KIM et al., 2016, KIM et al., 2018). A atividade antimicrobiana do kefir é geralmente atribuída a metabólitos secundários como ácidos orgânicos, álcoois e polissacarídeos antimicrobianos (POWELL et al. 2007; BOURRIE et al. 2016; KIM et al. 2016; JEONG et al. 2017).

Devido a grande diversidade molecular encontrada no kefir, oriunda da fermentação de diversos microrganismos, vários grupos decidiram estudar o efeito antimicrobiano de metabólitos produzidos por cepas isoladas dos grãos de kefir, especialmente *Lactobacillus* que é o gênero mais abundante nos grãos de kefir (POWELL et al, 2007. ATANASSOVA et al, 2014). Os resultados desses estudos demonstraram que isolados bacterianos derivados dos grãos de kefir são capazes de produzir peptídeos antimicrobianos denominados bacteriocinas (POWELL et al, 2007; PIPER et al , 2009).

As bacteriocinas podem ser classificadas como classe I, classe II e classe III de acordo com seu tamanho, estrutura e resistência ao calor. As bacteriocinas pertencentes a classe I são peptídeos menores que 5 kDa que contêm lantionina e 3-metilantionina, exemplo: Nisin A e Nuckacin ISK-1. As bacteriocinas da classe II são peptídeos estáveis ao calor, não contêm lantionina, e possuem massa menor que 10 kDa, exemplo: Leucocina A e Acidocina. As bacteriocinas de classe III são peptídeos muito sensíveis ao calor como as Helveticinas e Lactacinas A e B (PEREZ; PEREZ; ELEGADO, 2015).

Vários estudos mostraram que as bacteriocinas e outros peptídeos antimicrobianos produzidos por isolados bacterianos derivados dos grãos de kefir do leite, apresentam atividade inibitória contra leveduras, vírus e células cancerígenas, (POWELL et al, 2007; ATANASSOVA et al, 2014).

Em síntese, a maior parte dos estudos indica que a atividade antimicrobiana do kefir está relacionada à presença de bacteriocinas e metabólitos secundários como ácidos e álcoois, dentre outros. Todavia, as propriedades antimicrobianas do kefir e as moléculas relacionadas a ela ainda não foram completamente elucidadas, principalmente pelo fato do microbioma variar com a origem dos grãos (MORGAN et al, 2000).

No presente estudo avaliamos a atividade antimicrobiana do kefir de leite produzido por duas amostras de grãos de kefir provenientes de origens diferentes. A atividade antimicrobiana foi testada contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* que são patógenos oportunistas de relevância clínica (WHO, 2017).

3 OBJETIVOS

Determinar o efeito bactericida e/ou bacteriostático contra *S. aureus* e *P. aeruginosa* de duas amostras de kefir do leite produzidas por grãos de kefir do leite originado de fontes diferentes

Para isso, os seguintes objetivos específicos foram determinados:

- 1- Capacidade do soro de kefir de inibir a proliferação e o número de unidades formadoras de colônia de *S. aureus* e *P. aeruginosa*
- 2- Influência do pH na atividade antimicrobiana do soro de kefir.
- 3- Perfil molecular dos componentes do soro de kefir com atividade antimicrobiana
- 4- Microbiota presente nas amostras de grãos de kefir do leite utilizados nesse estudo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cepas bacterianas

As linhagens bacterianas utilizadas nesse estudo pertencem à coleção de bactérias patogênicas do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan. A coleção é mantida congelada em caldo tripticaseína de soja (TSB) (BD, Maryland, NY, EUA), com 40 % de glicerol em freezer -80°C . Para a experimentação, as cepas foram descongeladas e estriadas em placas de ágar tripticaseína de soja (TSA) e ágar MacConkey (BD, Maryland, NY, EUA) e incubadas a 37°C por 18 horas. Para verificar a pureza das cepas bacterianas, as amostras de *Staphylococcus aureus* foram isoladas em placas de TSA e a cepa de *Pseudomonas aeruginosa* isolada em placas de MacConkey. Para os ensaios, as colônias bacterianas isoladas das placas de TSA ou MacConkey foram semeadas em TSB. Assim, as cepas utilizadas nesse estudo foram: *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina isolado de uma cultura de DMEM (Dulbecco's Modified Medium) (SISGEN A08B202), como descrito nos itens 4.1.1 e 4.1.2, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

A cepa de *S. aureus* (SISGEN A08B202) foi escolhida para esse estudo por ser resistente a metilicina e a 5 classes diferentes de antibióticos, o que a classifica como bactéria multirresistente. A cepa de *S. aureus* ATCC 27853, além de ser utilizada como controle foi escolhida por ser produtora de B-lactamases. A cepa de *Pseudomonas aeruginosa* foi escolhida como representante do grupo de bactérias Gram-negativas de importância clínica.

4.1.1 Isolamento e identificação da cepa bacteriana isolada de uma cultura de DMEM.

A cepa de *S. aureus* resistente a metilicina utilizada nesse estudo foi isolada no Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan de uma cultura celular em DMEM. Resumidamente, células Hep-2 foram cultivadas em meio DMEM com antibiótico (ampicilina/estreptomicina) em uma estufa de 5 % de CO_2 a 37°C por 18 horas. Após a incubação, foi observado que havia crescimento bacteriano na cultura celular. Consequentemente, 100 μL do meio DMEM da cultura foram adicionados a

3 mL de TSB que foram subsequentemente incubados em estufa bacteriológica por 18 h a 37 °C. Após a incubação, a cultura em TSB foi estriada em TSA e MacConkey para o isolamento das colônias bacterianas. Após incubação das placas em estufa bacteriológica por 18 h a 37 °C observou-se que não houve crescimento de colônias na placa de MacConkey somente na placa de TSA de onde as colônias foram coletadas para identificação pelo sistema de identificação disponível comercialmente API-Staph (Biomerieux, France), seguindo as instruções do fabricante.

Resumidamente, o kit de diagnóstico API-Staph é um sistema bioquímico para identificação dos generos *Staphylococcus*, *Micrococcus* e *Kocuri*. Ele é formado por um sistema miniaturizado de reações bioquímicas (Tabela 1) associado a um programa (apiweb™) e banco de dados adaptado para leitura dos testes e identificação bacteriana.

Tabela 1- Tabela de Leitura Api STAPH

TESTE	INGREDIENTES ATIVOS	RESULTADO NEGATIVO	RESULTADO POSITIVO
0	Sem substrato	Vermelho	-
GLU FRU MNE MAL LAC TRE MAN XLT MEL	D-glicose D- frutose D-manose D-maltose D-lactose D-trealose D-manitol Xilitol D-melibiose	Vermelho	Amarelo
NIT	Nitrato de potassio	Rosa claro incolor	Vermelho
PAL	Fosfato alcalina	Amarelo	Violeta
VP	Piruvato de sódio	Rosa claro incolor	Violeta-pink
RAF XYL SAC MDG NAG	D- rafinose D-xilose D-sacarose metil-alfaD-glucopiranosídeo N-acetil-glucosamina	Vermelho	Amarelo
ADH	L-arginina	Amarelo	Laranja avermelhado
URE	Urea	Amarelo	Vermelho-violeta

Fonte: Adaptada de API STAPH (2013)

4.1.2 Determinação de resistência das amostras de *S.aureus* a metilicina/oxacilina

Para determinar a suscetibilidade à meticilina da cepa de *Staphylococcus aureus* derivada da cultura celular de DMEM e da cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC, as culturas bacterianas crescidas em TSB por 18 h a 37 °C foram estriadas em placas de TSA para o isolamento de colônias. Após, incubação de 18 h a 37 °C, colônias de *S. aureus* foram coletadas e homogeneizadas em 3 mL de solução salina 0,85% até alcançarem uma turbidez correspondente a 0,5 na escala de MacFarland. Em seguida, a suspensão foi homogeneizada e espalhada uniformemente em placas de ágar Müeller-Hinton com auxílio de um “swab” estéril, a fim de assegurar a distribuição homogênea do inóculo. Após 5 minutos de incubação a temperatura ambiente, discos de Oxacilina e Cefoxitina foram colocados a uma distância de 25 mm um do outro com auxílio de uma pinça estéril (CLSI, 2015a; CLSI, 2015b).

As placas de TSA contendo o inóculo bacteriano e os discos foram então incubados em estufa bacteriológica a 37 °C por 18 horas. De acordo com o estabelecido pela CLSI (CLSI, 2015a; CLSI, 2015b), uma cepa é considerada MRSA (*S. aureus* resistente à meticilina) quando ocorre a formação de um halo ao redor do disco de antibiótico de diâmetro menor do que 12 mm.

4.1.3 Antibiograma

A susceptibilidade antimicrobiana de todas as cepas bacterianas utilizadas nesse estudo foi determinada pelo método padrão de disco-difusão realizado segundo o método de Kirby-Bauer (BAUER et al.,1965), seguindo as normas da CLSI (The Clinical and Laboratory Standards Institute) concedidas à Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) (documento M02-A12) (CLSI, 2015a). Os antibióticos utilizados estão descritos na Tabela 2. Eles foram gentilmente doados pela CEFAR (São Paulo, Brasil).

Tabela 2-Antimicrobianos e potências dos discos

ANTIMICROBIANO	POTÊNCIA DO DISCO
Acido nalidixico	30 µg
Amicacina	30 µg
Amoxicilina + ac. Clavulânico	30 µg
Ampicilina	10 µg
Azitromicina	15µg
Aztreonam	30µg
Cefepima	30 µg
Cefotaxima	30 µg
Cefoxitina	30 µg
Ceftazidima	30 µg
Ceftriaxona	30 µg
Ciprofloxacina	5 µg
Cotrimoxazol	25µg
Ertapenem	10 µg
Fosfomicina	200 µg
Gentamicina	10 µg
Imipenem	10 µg
Levofloxacina	5 µg
Meropenem	10 µg
Nitrofurantoina	300 µg
Oxacilina	1 µg
Sulfonamida	300 µg

Os testes foram realizados da seguinte maneira: foi preparada uma suspensão bacteriana em 3 mL de solução salina (0,9%) com turbidez equivalente ao padrão 0,5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Um “swab” de algodão estéril foi introduzido na suspensão e pressionado nas paredes do tubo a fim de remover o excesso de caldo. Em seguida, o “swab” foi esfregado uniformemente sobre a superfície de ágar Mueller Hinton em placas de Petri, como recomendado pelo CLSI para testes de sensibilidade de aeróbicos.

Após 15 minutos de incubação a temperatura ambiente, foram adicionados em cada placa de 4 a 5 discos de antibióticos. As placas foram subsequentemente incubadas a 37°C por um período de 16 a 18 horas.

Após incubação, o diâmetro dos halos das zonas de inibição (incluindo o diâmetro do disco) foi medido com uma régua. As amostras foram classificadas como sensíveis intermediárias ou resistentes segundo o tamanho estabelecido pelo CLSI (documento M100-S27) (CLSI, 2017; LTDA, 2017).

4.2 Grãos de kefir: origem e microbiota

Duas amostras de grãos de kefir de leite, denominadas Grãos de Kefir 1 e Grãos de Kefir 2, foram utilizadas neste estudo. Ambas foram gentilmente doadas pelo padre Luciano Piotrovski, São Paulo, SP, Brasil, que as obteve de fontes diferentes que não puderam ser rastreadas.

Para a identificação das bactérias presentes nos grãos foi utilizada a técnica de Sequenciamento do gene 16S RNAr. A identificação das bactérias presentes nos dois lotes de grãos de kefir utilizados neste trabalho foi realizada pelo Dr. Sabri Sanabani, do Laboratório de Investigação Médica em Dermatologia e Imunodeficiência do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, de acordo com a metodologia descrita por Fonseca e colaboradores (2015).

Para isso, o DNA genômico foi extraído das amostras de grãos de kefir através do kit PowerSoil DNA (MO BIO Laboratories™: Carlsbad, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Após a extração, o DNA foi submetido à amplificação das regiões V3 e V4 do gene 16S RNAr utilizando o protocolo de reação em cadeia da polimerase (PCR) “two-step” com os *primers* Bakt_341F/Bakt_805R (HERLEMANN et al., 2011). A primeira PCR foi realizada para amplificar o gene marcado e a próxima reação foi conduzida para introduzir os *primers* Nextera XT index em cada produto das amostras. Todas as reações foram feitas de acordo com as condições previamente estabelecidas e descritas pelo grupo citado acima (FONSECA et al., 2015; FONSECA et al., 2016).

A purificação dos produtos amplificados foi realizada utilizando o kit DNA Freeze N Squeeze (Bio-Rad: Hercules, CA, USA), seguindo as recomendações do fabricante. Após a purificação e quantificação com o Qubit 2.0 Fluorometer (Life Technologies: Carlsbad, CA, USA), os amplicons indexados da amostra foram agrupados em concentração equimolar e diluídos a 4nM. A biblioteca preparada foi finalmente carregada em um cartucho Illumina MiSeq para o sequenciamento emparelhado do terminal 300.

A análise de imagens, a chamada de base e a avaliação da qualidade dos dados foram inicialmente realizadas pelo MiSeq (San Diego, CA, EUA). A limpeza das sequências e as análises foram conduzidas de acordo com os métodos padronizados por Fonseca et al. (2015) e Fonseca et al. (2016).

O software PANDAseq v.2.9 foi utilizado para parear as leituras MiSeq forward and reverse com parâmetros padrões (MASELLA et al., 2012). O algoritmo UCHIME (EDGAR et al., 2011) foi utilizado para detectar e remover qualquer sequência recombinante em potencial com base nos dados gerados. O banco de dados EzTaxon-e (KIM et al., 2011) foi ajustado para um *cut off* de 97% de acordo com a identidade de similaridade de sequência utilizada para definir a classificação de cada leitura. A estimativa Chao 1 e o índice de diversidade de Shannon a uma distância de 3% foram utilizados para calcular a riqueza e diversidade das amostras. Os softwares Mothur and Shannon-ace-table.pl (Chunlab Inc.: Seoul, Korea) foram utilizados para computar o índice de diversidades da comunidade bacteriana. O Fast UniFrac (HAMADY; LOZUPONE; KNIGHT, 2009) foi utilizado para estimar a distância filogenética geral entre as comunidades. Essa distância foi visualizada utilizando uma análise de coordenadas principais (PCoA). As unidades taxonômicas operacionais compartilhadas (OTUs) foram identificadas usando a análise XOR do programa da comunidade CL v3.43 (Chunlab Inc.: Seoul, Korea). Os dados do MPS foram carregados no Zenodo: <https://doi.org/10.5281/zenodo.3560871>.

4.3 Obtenção de kefir

Para obtenção do kefir, 200 gramas de cada amostras de grão de kefir foram incubados separadamente à temperatura ambiente em 1L de leite integral bovino pasteurizado (Fazenda Boa Vista) previamente fervido. As incubações foram mantidas até o leite atingir uma consistência semelhante ao iogurte, o que ocorreu após aproximadamente 18 h de incubação. Subseqüentemente, os grãos de kefir 1 e 2 foram coados separadamente em uma peneira para obtenção da fase líquida. Em seguida as duas amostras de grãos foram novamente incubadas em um novo leite. Esse processo foi repetido até o final dos experimentos.

4.4 Obtenção do soro de kefir

Para separar o soro de kefir do leban (parte branca do kefir), as amostras de kefir denominadas kefir 1 e kefir 2 que foram obtidas pela fermentação de grãos de kefir de diferente origens, foram centrifugados a 8000 g por 10 minutos a 25 °C. Subseqüentemente, os sobrenadantes (soro de kefir 1 e 2) foram coletados

separadamente e centrifugados duas vezes como descrito anteriormente. Após a última centrifugação, cada soro de kefir foi filtrado em uma membrana de 0,22 µm em uma câmara de fluxo laminar e mantido a 4 ° C ou congelado até o uso. Um litro de kefir 1 ou 2 produziu 250 mL de soro de kefir.

4.5 Fracionamento e caracterização do soro de kefir

4.5.1 Separação do soro de kefir em frações moleculares

Para obter as diferentes frações moleculares do kefir, o soro de kefir foi submetido a dois processos, um que utilizou Centricon YM-10 da Milipore e outro que utilizou membrana de diálise para separação. Duas frações foram obtidas utilizando os dispositivos Centricon YM-10 com poros de membrana de 10 kDa. As frações foram separadas seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, 20 mL de soro de kefir foram adicionados aos dispositivos Centricon que em seguida foram centrifugados por 20 min a 2180 g a 4 °C. Após a centrifugação, o soro de kefir foi separado em duas frações moleculares, uma com massa superior a 10 kDa e outra com massa inferior a 10 kDa.

Uma terceira fração molecular foi obtida submetendo a fração com massa menor que 10 kDa a uma diálise em tubos de membrana com poros de 1 kDa para eliminar as moléculas com massa menor que 1 kDa e obter uma fração com massa molecular entre 1 e 10 kDa.

A amostra de soro de kefir foi separada em mais duas frações moleculares por diálise, uma com massa superior a 1 kDa e outra com massa inferior a 1 kDa. Para isso, o soro de kefir foi dialisado contra água destilada autoclavada usando tubos de diálise com poros de membrana de 1 kDa. Como resultado, as moléculas do soro de kefir foram separadas em duas frações moleculares, uma com massa superior a 1 kDa (dentro do tubo de membrana) e outra com massa inferior a 1 kDa presente na água usada para diálise. Para obter a fração com massa menor do que 1 kDa, a água da diálise foi coletada, liofilizada e o sedimento foi tratado de duas maneiras: ressuspenso em água destilada autoclavada para o volume original da amostra submetida à dialise para os experimentos descritos no item 4.7, ou pesado e utilizado em diferentes concentrações para o experimento descrito no item 4.8.

Em resumo, o soro de kefir foi separado em cinco frações moleculares: uma fração com massa superior a 10 kDa, uma fração com massa inferior a 10 kDa, uma fração com massa entre 1 e 10 kDa, uma fração com massa superior a 1 kDa e uma fração com massa menor que 1 kDa. As propriedades antimicrobianas das frações foram determinadas.

4.5.2 SDS-PAGE Tris-tricina

Os perfis eletroforéticos do soro de kefir e de suas respectivas frações moleculares foram determinados através de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), segundo Schägger (2006). O gel de empilhamento foi feito com 4% da solução de acrilamida e bisacrilamida (48g de acrilamida e 1,5g de bisacrilamida em 100 mL de água), enquanto, para o gel espaçador e para o gel de separação foi utilizado 10% e 16%, respectivamente, da solução acrilamida e bisacrilamida (46,5g de acrilamida e 3g de bis acrilamida em 100 mL de água). O gel de poliacrilamida foi então montado em cuba vertical de eletroforese com tampão de corrida eletroforética para passagem de corrente elétrica (Tampão ânodo: Tris base 0,2M, ph 8,9; tampão Catodo: Tris base 0,1M, Tricina 0,1M e SDS 0,1%). A amostra de soro foi preparada da seguinte maneira: o soro foi diluído 1:2 em tampão de amostra e aquecido à 37 °C por 10 minutos (Sigma, S3401). Posteriormente, a amostra foi colocada no gel que em seguida foi submetido a uma voltagem de 30 V durante a migração das moléculas no gel de empilhamento e, posteriormente, 200 V para a migração das moléculas no gel de separação. Como marcador molecular foi utilizado o Low Range Rainbow (Sinapse biotecnologia, RPN 755E).

4.5.3 Espectrometria de Massa

A fração molecular do kefir com massa abaixo de 1kDa foi analisada por espectrometria de massas pelo Dr. Hugo Vigerelli no Laboratório de Bioquímica do Instituto Butantan. A análise foi feita por injeção direta em um espectrômetro ESI-IT-Tof (Simadzu Co., Japão) equipado com sistema de cromatografia UFLC (20A Prominence, Shimadzu Co., Japão), com solventes (A) ácido acético / H₂O (1:1000) e (B) ácido acético / acetonitrila / H₂O (1:900:100) em fluxo constante de 0,2 mL/min.

A voltagem da interface utilizada foi de 4,5 kV e a voltagem do detector, 1,76 kV, com temperatura de 200°C e os espectros foram obtidos em modo positivo de ionização na faixa de 50 a 2000 m/z. Os dados obtidos foram analisados pelo software LCMS solution (Shimadzu Co., Japão).

4.6 Proliferação bacteriana

A atividade antimicrobiana dos soros de kefir e suas respectivas frações moleculares sobre a proliferação bacteriana foi determinada medindo a densidade óptica da cultura bacteriana a 595 nm em um leitor de microplacas Multiskan Ex (LabSystems). Para isso, foram preparadas suspensões bacterianas em solução salina 0,9% com turbidez equivalente ao padrão 0,5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL), a partir de colônias isoladas em TSA e diluídas em solução salina 0,9% até atingir a quantidade de 10^4 UFC/mL. Alíquotas de 10 µL dessa suspensão bacteriana foram adicionadas aos poços de uma placa de cultura de 96 poços contendo 90 µL de caldo MH mais 100 µL/poço de PBS em pH 5 e 7 (controle de crescimento) ou 90 µL de caldo MH mais 100 µL/poço de soro de kefir e/ou suas frações em pH 5 ou 7. Em seguida a placa foi incubada por 18 h a 37 ° C e a proliferação bacteriana foi determinada pela leitura da densidade óptica a 595 nm.

4.7 Contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC)

A mesma placa de cultura utilizada para o ensaio de proliferação foi utilizada para o teste de contagem de unidades formadoras de colônia (UFC), com o intuito de verificar a atividade bactericida do soro de kefir e de suas respectivas frações. O ensaio foi realizado da seguinte maneira, após a leitura da densidade óptica feita para determinar a proliferação bacteriana, foram coletadas 100 µL de cultura de cada poço da placa para determinar o número de unidades formadoras de colônia. O número de UFC foi determinado de acordo com o protocolo estabelecido por Baron et al. (2006) e Beck et al. (2009). Para isso, 100 µL de cultura de cada poço foram adicionados a 900 µL de salina 0,9 % e subsequentemente submetidos a 24 diluições seriadas em fator de 1/10. Em seguida, 10 µL de cada diluição foram adicionados em triplicata em placas de TSA que em seguida foram incubadas por 18 horas a 37°C.

Para determinar o número de bactérias, foram consideradas as diluições com números de UFC de 3 a 30. Para a determinação das UFC/mL, o número de colônias obtido foi multiplicado pelo fator de correção 100 e pela diluição.

Foi considerado efeito bactericida quando ocorre mais do que 99 % de inibição do número de UFC (SHAM; ALMASRI, 2018).

4.8 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) da fração do kefir com massa abaixo de 1 kDa

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM – menor concentração que um antimicrobiano precisa para inibir o crescimento visível de um microrganismo, caracterizando a sua atividade bacteriostática) da fração com massa abaixo de 1 kDa foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, de acordo com o CLSI (documento M26-A) (CLSI, 1999). Para isso, em uma placa de 96 poços estéril com fundo chato, foram adicionados 50 µL/poço de diferentes concentrações da fração molecular menor do que 1 kDa diluída em caldo Mueller Hinton em pH 5 e 7. Subsequentemente 50 µL/poço de cada cultura bacteriana crescida em Mueller Hinton (10^5 /mL) foram adicionadas as diluições da fração na placa de 96 poços. Em seguida, a placa foi incubada por 18 horas a 37 °C. Após esse período, foi realizada a leitura visual e de DO a 595 nm em leitor de ELISA, para avaliação do crescimento das bactérias. Após leitura da densidade óptica da placa, foi realizado o ensaio de UFC (item 4.7).

4.9 Análise estatística

Para análise de dados foi utilizado o Teste t Student empregando o software Prism 5. Valores com $P \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS

5.1 Identificação da Cepa bacteriana isolada no meio de cultura DMEM e caracterização da resistência a antibióticos

O resultado obtido foi correspondente ao número 6734151 que no programa APIweb indica 96,1 % de certeza para *Staphylococcus aureus*.

Figura 6- Identificação Bioquímica de *S. aureus*

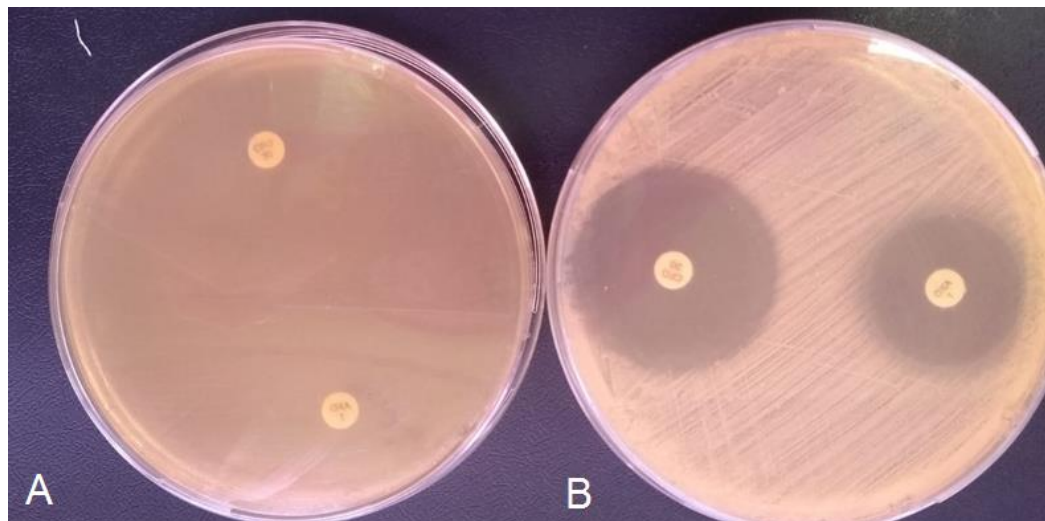
API STAPH V5.0							
REFERÊNCIA	DATA						
<input type="text"/>	<input type="text" value="15/07/2016"/>						
COMENTÁRIO	<input type="text"/>						
BOA IDENTIFICAÇÃO							
Galeria	API STAPH V5.0						
Perfil	6 7 3 4 1 5 1						
Nota(s)	POSSIBILIDADE DE <i>S.intermedius</i> SE VETERINÁRIO						
Taxa significativos	% ID	T	Teste(s) discordantes				
<i>Staphylococcus aureus</i>	96.1	0.79	NIT 83%	URE 80%			
Taxon seguinte	% ID	T	Teste(s) discordantes				
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1.6	0.57	MNE 5%	NIT 78%	PAL 15%		
Teste(s) complementare(s)	AMARELO	TURANOSEac					
<i>Staphylococcus aureus</i>	+(-)	+(-)					
<i>Staphylococcus intermedius</i>	-	-					

Resultados obtidos com a identificação bioquímica da cultura bacteriana isolada de DMEM. Galeria após incubação a 37°C por 24 horas. Testes: 0 (controle negativo -), GLU (Glicose +), FRU (Frutose +), MNE (Manose +), MAL (Maltose +), LAC (Lactose +), TRE (Trealose +), MAN (Manitol +), XLT (Xilitol -), MEL (Melibiose -), NIT (Redução de Nitrato -), PAL (Fosfatase alcalina +), VP (Voges Proskauer +), RAF (Rafinose -), XYL (Xilose -), SAC (Sacarose +), MDG (Metil-D-glicopiranosideo -), NAG (N-acetil-glucosamina +), ADH (Arginina-D-hidrolase +), URE (Urease -).

Quanto à sensibilidade a metilicina, o resultado obtido com o teste de disco difusão modificado (CLSI, 2015a; CLSI, 2015b) revelou que a cepa de *S. aureus* isolada do meio de cultura DMEM não formou halo de inibição frente aos antibióticos metilicina e oxacilina (Figura 7A) indicando que essa cepa é resistente a metilicina, portanto, sendo classificada e denominada como MRSA (Meticillin Resistant *S. aureus*). Por outro lado, a cepa de *S. aureus* ATCC, formou um halo de

sensibilidade maior do que 12 mm ao redor dos discos de metilina e oxacilina, indicando ser sensível a esses antibióticos (Figura 7B).

Figura 7 - Determinação de resistência à metilina das cepas de *S aureus*.



S aureus isolada do meio de cultura DMEM (A), *S aureus* ATCC 25923 (B). Foi considerado como resistente a metilina a formação de um halo ao redor do disco de antibiótico de diâmetro menor do que 12 mm de acordo com o estabelecido pela CLSI (CLSI, 2015a; CLSI, 2015b).

Para determinar o perfil antimicrobiano das amostras bacterianas utilizadas nesse estudo utilizamos o método descrito por Kirby-Bauer (1965) onde 22 antibióticos de 6 classes diferentes (Beta-Lactâmicos, aminoglicosídeos, quinolonas, sulfanamidas, fosfomicina e macrolídeos) foram utilizados. O resultado do teste de Kirby-Bauer mostrou que a cepa de *S. aureus* isolada do meio de cultura DMEM (MRSA) é resistente a 11 antibióticos de três classes diferentes: Beta lactâmicos, Aminoglicosídeos e Quinolonas (Tabela 3). Desde que, a definição de uma bactéria multirresistente é ser resistente a pelo menos um antibiótico de três classes diferentes (FALAGAS; KOLETISI; BLIZIOTIS, 2006; MAGIORAKOS et al., 2012), a cepa de *S. aureus* isolada da cultura de DMEM nesse estudo pode ser considerada multirresistente.

Por outro lado, a amostra de *S. aureus* ATCC 25923, obtida do banco do ATCC mostrou resistência intermediária ao ácido nalidixico pertencente à classe das quinolonas e resistência a sulfonamida (Tabela 3). A amostra de *P. aeruginosa* ATCC 27853, também obtida do banco do ATCC, utilizada nesse estudo mostrou resistência apenas ao ácido nalidixico (Tabela 3).

Em resumo, os resultados mostraram que a cepa bacteriana isolada no Laboratório de Bacteriologia, de uma cultura de DMEM contaminada ambientalmente, trata-se de uma MRSA multi-resistente a antibióticos.

Tabela 3- Antimicrobianos e perfil de resistência das cepas.

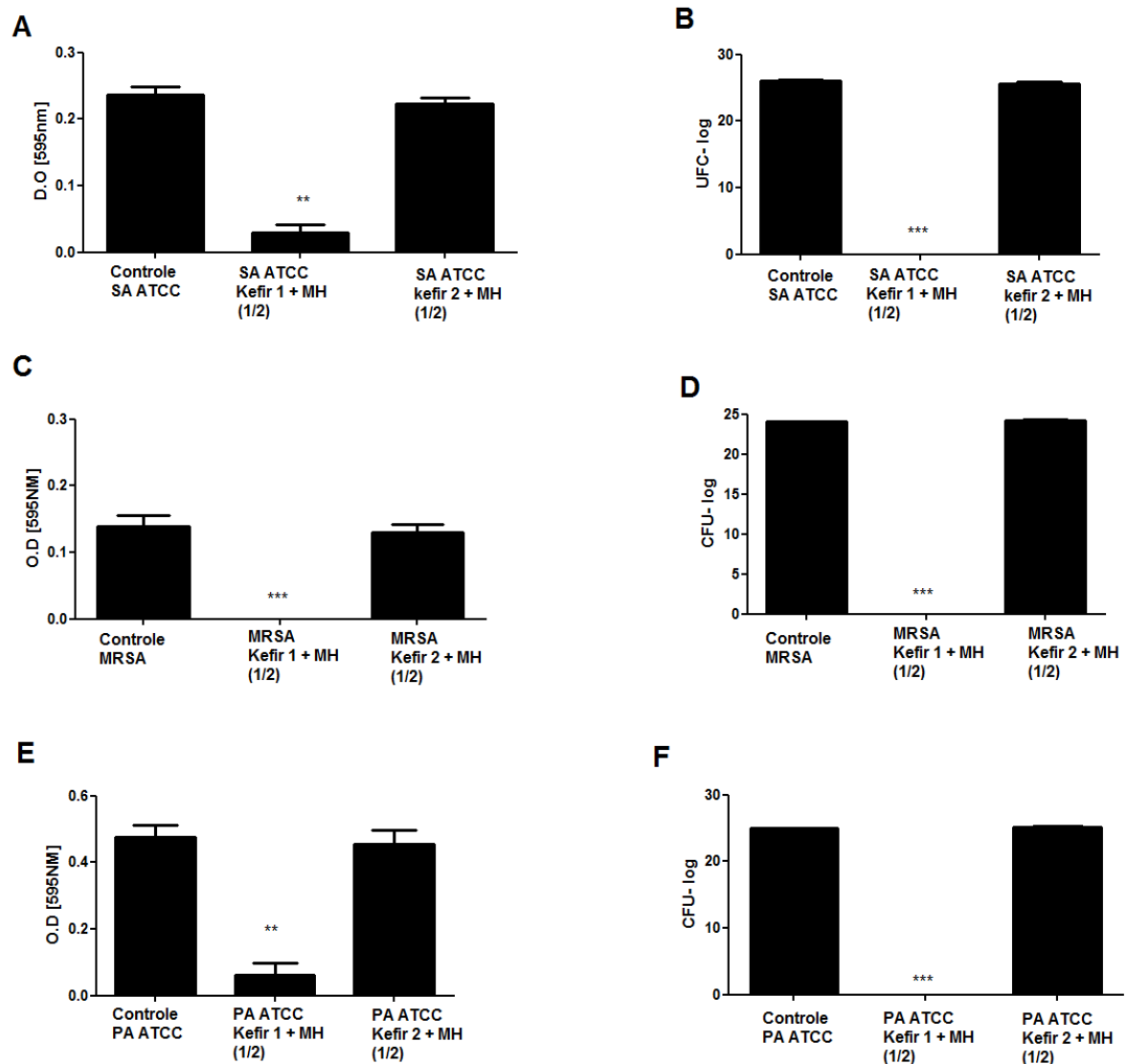
Antibióticos	Classe	PA ATCC	MRSA	SA ATCC
Ácido nalidixico	Quinolonas	RESISTENTE	RESISTENTE	INTERMED.
Amicacina	Aminoglicosídeos	SENSÍVEL	RESISTENTE	SENSÍVEL
Amoxicilina + ac. clavulânico	Penicilina/ β lactâmicos	[NU]	RESISTENTE	SENSÍVEL
Ampicilina	Penicilina/ β lactâmicos	[NU]	RESISTENTE	SENSÍVEL
Azitromicina	Macrolídeos	SENSÍVEL	SENSÍVEL	SENSÍVEL
Aztreonam	β lactâmicos	SENSÍVEL	RESISTENTE	SENSÍVEL
Cefepima	Cefalosporina/ β lactâmicos	SENSÍVEL	RESISTENTE	SENSÍVEL
Cefotaxima	Cefalosporina/ β lactâmicos	SENSÍVEL	RESISTENTE	SENSÍVEL
Cefoxitina	Cefalosporina/ β lactâmicos	SENSÍVEL	RESISTENTE	SENSÍVEL
Ceftazidima	Cefalosporina/ β lactâmicos	SENSÍVEL	RESISTENTE	SENSÍVEL
Ceftriaxona	Cefalosporina/ β lactâmicos	SENSÍVEL	RESISTENTE	SENSÍVEL
Ciprofloxacino	Quinolonas	SENSÍVEL	SENSÍVEL	SENSÍVEL
Cotrimoxazol	Sulfonamidas	SENSÍVEL	SENSÍVEL	SENSÍVEL
Ertapenem	Carbapenem/ β lactâmicos	[NU]	SENSÍVEL	SENSÍVEL
Fosfomicina	Fosfomicina	[NU]	[NU]	SENSÍVEL
Gentamicina	Aminoglicosídeos	SENSÍVEL	SENSÍVEL	SENSÍVEL
Imipenem	Carbapenem/ β lactâmicos	SENSÍVEL	SENSÍVEL	SENSÍVEL
Levofloxacina	Quinolonas	SENSÍVEL	SENSÍVEL	SENSÍVEL
Meropenem	Carbapenem / β lactâmicos	SENSÍVEL	SENSÍVEL	SENSÍVEL
Nitrofurantoina	Quinolonas	[NU]	SENSÍVEL	SENSÍVEL
Oxacilina	Penicilina/ β lactâmicos	[NU]	RESISTENTE	SENSÍVEL
Sulfonamida	Sulfonamidas	[NU]	SENSÍVEL	RESISTENTE

INTERMD: INTERMEDIÁRIO; SDD: SUSCETIVEL/DOSE DEPENDENTE E NU: NÃO UTILIZADO.

5.2 Ação antimicrobiana do soro de kefir em pH 5 produzido por duas amostras de grãos de kefir do leite .

O efeito antimicrobiano do soro do kefir produzido por duas amostras diferentes de grãos de kefir de leite foi testado contra uma cepa Gram-negativa e duas cepas Gram-positivas, representadas por *P. aeruginosa* ATCC 27983, *S. aureus* ATCC 25923 e MRSA, respectivamente. Os testes foram realizados em pH 5, cujo valor se aproxima do pH natural das amostras de kefir utilizadas nesse estudo que varia entre 4.2 e 4.6 (Figura 8). Em pH 5, as amostras bacterianas utilizadas nesse estudo cresceram normalmente e não apresentaram diferenças de crescimento quando cultivadas em pH 7. As cepas das bactérias controle, representam culturas em que apenas o pH 5 foi mantido, porém sem a adição do soro de Kefir. É possível observar que apenas o soro de kefir 1 apresentou atividade antimicrobiana contra todas as cepas testadas (Figura 8), sugerindo que a origem dos grãos de Kefir influencia os seus efeitos antimicrobianos.

Figura 8- Atividade antimicrobiana de duas amostras diferentes de soro de kefir em pH5.



A capacidade do soro de kefir produzido por duas amostras diferentes de grãos em inibir a proliferação (A, C, E) e o número de Unidades Formadoras de Colônia - UFC/mL (B, D, F) foram determinadas após incubação das amostras bacterianas por 18 h a 37 °C na presença ou ausência de soro de kefir 1 ou soro de kefir 2 em pH 5. Para os controles, as bactérias foram incubadas com Meio Mueller Hinton (MH) diluído 1:2 em PBS em pH 5. O resultado da proliferação foi estabelecido pela leitura da densidade ótica em 595 nm e a morte bacteriana foi determinada pela contagem de UFC/mL. As amostras bacterianas utilizadas foram: *S. aureus* ATCC 25293- SA ATCC (A,B), *S. aureus* resistente a meticilina – MRSA (C, D) e *P. aeruginosa* ATCC 27853 - PA ATCC (E,F). Valores com $P \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Uma vez observado efeitos divergentes entre as amostras de soro de kefir 1 e 2, que foram produzidas por grãos de diferentes origens, decidimos avaliar a microbiota dos grãos de kefir que originaram estes soros.

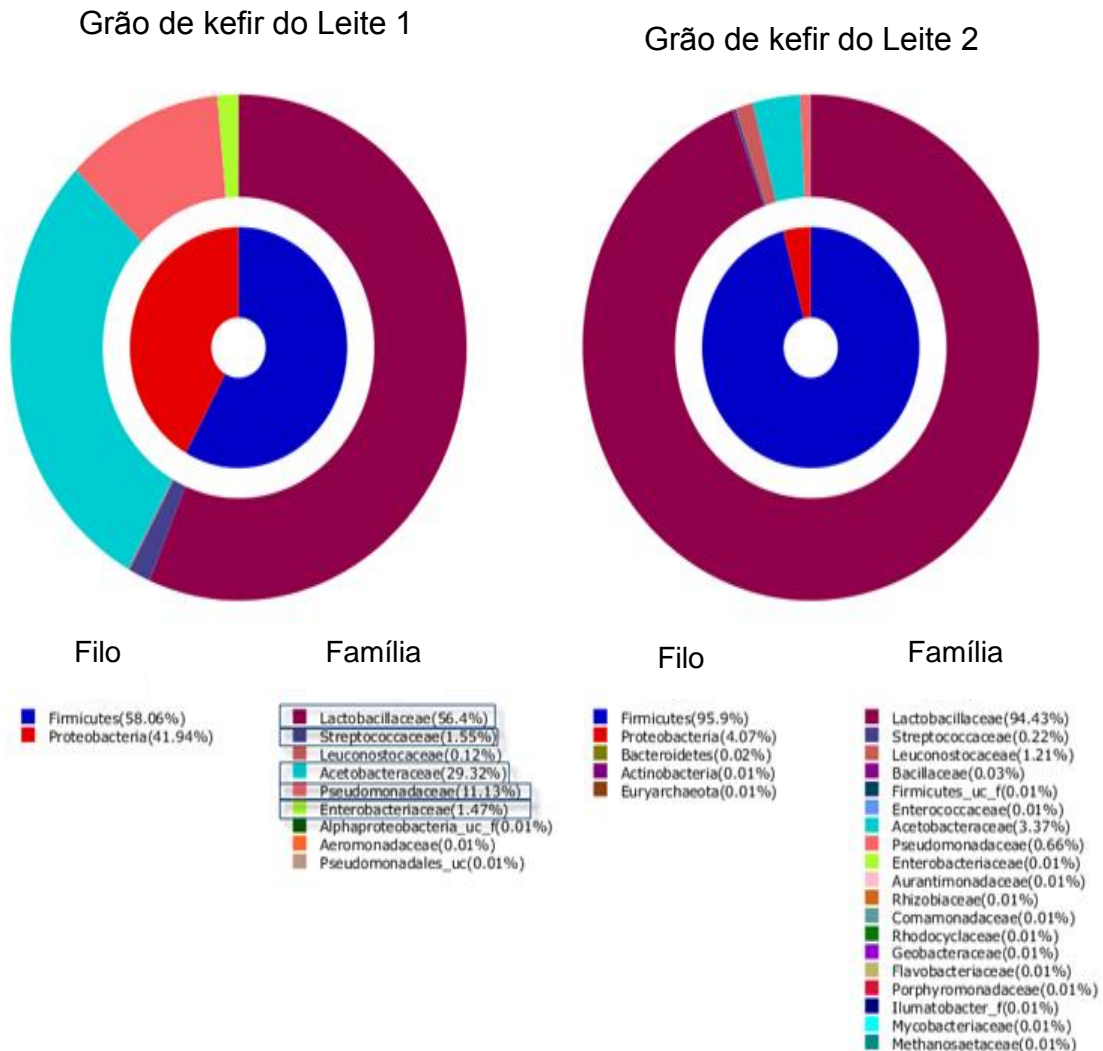
5.3 Microbiota dos grãos de kefir (1 e 2)

É conhecido que as propriedades biológicas do kefir estão relacionadas com a origem dos grãos e o microbioma dos mesmos. Sendo assim, decidimos verificar se existiria uma grande diferença entre a microbiota presente nos grãos que produziram soro de kefir com atividade antimicrobiana comparada com os grãos que produziram soro de kefir sem atividade antimicrobiana contra os patógenos testados. Determinamos apenas a microbiota bacteriana dos grãos e não o microbioma inteiro, que inclui as leveduras, uma vez que as bactérias são responsáveis pela produção da maior parte dos antibióticos descritos (PROCÓPIO et al, 2012).

A microbiota bacteriana presente nos grãos, foi então determinada pelo método de sequenciamento do gene 16S RNAr. Os resultados obtidos pela análise do sequenciamento do gene 16S RNAr mostraram a presença de 9 famílias diferentes de bactérias nos grãos que produzem o soro de kefir com atividade antimicrobiana (grão de kefir 1), em contraste com 19 famílias bacterianas presentes nos grãos que produziram soro de kefir sem atividade antimicrobiana (grão de kefir 2). As principais famílias presentes nos grãos que produziram soro de kefir com propriedades antimicrobianas foram: *Lactobacillaceae* (56,4%), *Acetobacteraceae* (29,32%), *Pseudomonadaceae* (11,13%) e *Streptococcaceae* (1,55%) (Figura 9).

Por outro lado, apesar de serem encontradas 19 famílias diferentes de bactérias nos grãos que produziram soro de kefir sem atividade antimicrobiana, 16 delas representam menos de 6 % das bactérias identificadas nos grãos, sendo a família *Lactobacillaceae* responsável por 94,43 % das bactérias encontradas (Figura 9).

Figura 9- Famílias e filos das bactérias presentes nos grãos de kefir do leite, com atividade antimicrobiana (Grão de kefir do Leite 1) e sem atividade antimicrobiana (Grão de Kefir do Leite 2).



Sequenciamento do gene 16S RNAr para identificação da microbiota presente nas duas amostras de grãos de kefir do leite.

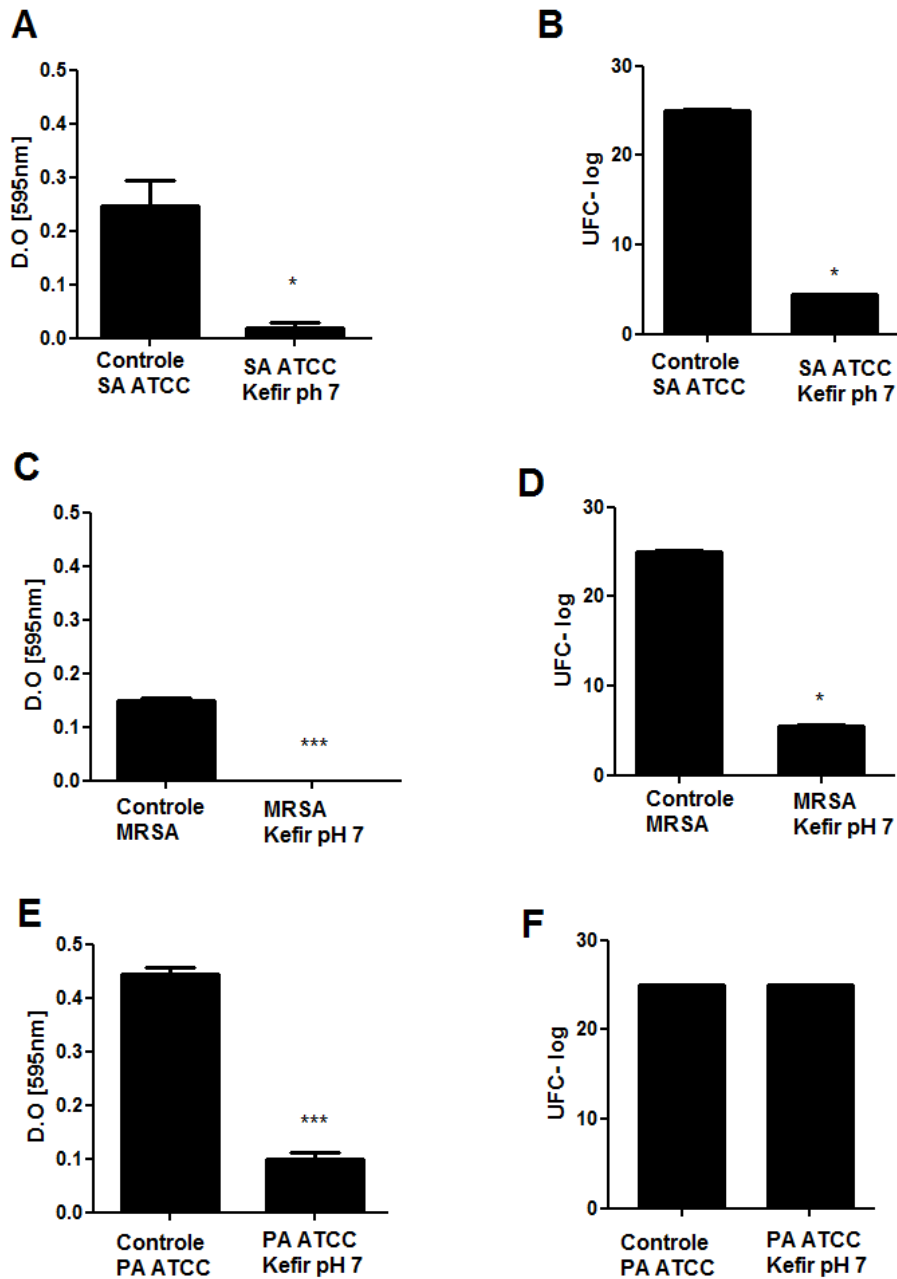
Esses resultados indicam que não apenas a quantidade de bactérias, mas também a diversidade das cepas contidas nos grãos de Kefir, interferem nos efeitos encontrados.

A partir desses dados, optamos por utilizar apenas a amostra de soro de kefir que mostrou atividade antimicrobiana contra as bactérias testadas. Sendo assim, os experimentos seguintes foram realizados apenas com o soro de kefir que mostrou atividade antimicrobiana (Soro de kefir 1).

5.4 Ação antimicrobiana do soro de kefir 1 em pH 7

Uma vez que observamos que o soro de kefir 1 tem efeito bactericida contra *S. aureus* ATCC, MRSA e *P. aeruginosa* em pH 5 (Figura 8). Resolvemos então determinar se o soro de kefir ainda manteria sua atividade antimicrobiana em pH neutro. Dessa forma alteramos o pH do soro de kefir para 7 e testamos sua capacidade de inibir a proliferação ou reduzir o número de UFCs das amostras de *S. aureus* ATCC, MRSA e *P. aeruginosa*. Os resultados mostraram que o soro de kefir em pH 7 foi bactericida para as amostras de *S. aureus* ATCC e MRSA desde que foi capaz de inibir em mais de 99 % o número de UFC/mL dessas bactérias. No entanto, o soro de kefir em pH 7 não afetou o número de UFC/mL de *P. aeruginosa*, somente inibiu sua proliferação, sendo considerado, portanto, bacteriostático para esse patógeno (Figura 10).

Figura 10- Atividade antimicrobiana do Soro de Kefir 1 em pH 7

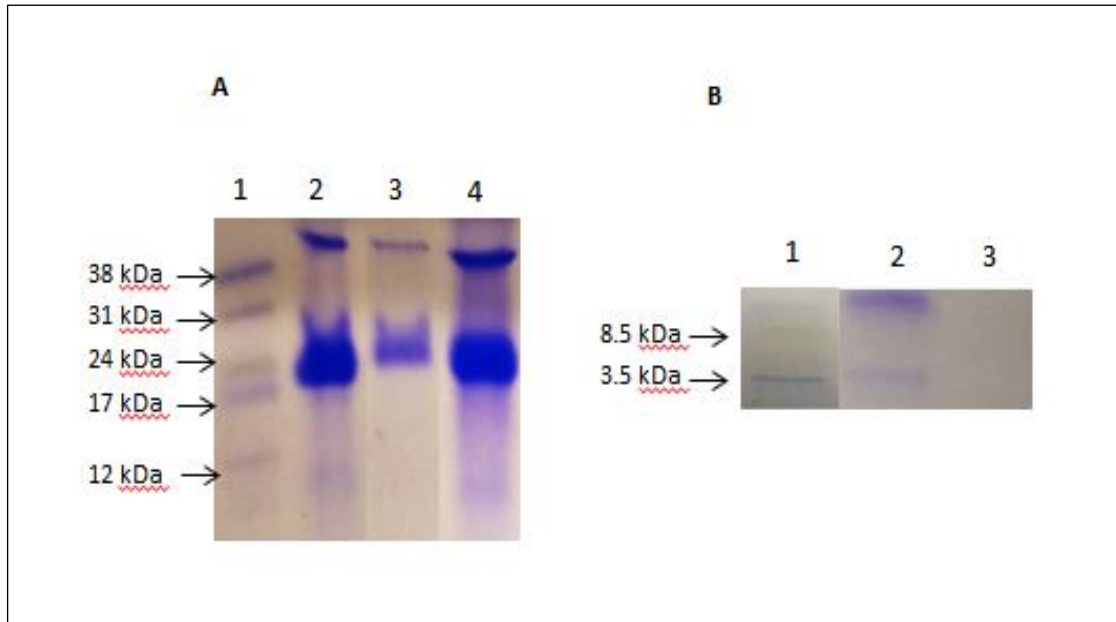


A capacidade do soro de kefir de inibir a proliferação (A, C, E) e o número de Unidades Formadoras de Colônia - UFC/mL (B, D, F) foram determinadas após incubação das amostras bacterianas por 18 h a 37 °C na presença ou ausência de soro de kefir em pH 7. Para os controles, as bactérias foram incubadas com Meio Mueller Hinton (MH) diluído 1:2 em PBS em pH 7. O resultado da proliferação foi estabelecido pela leitura da densidade ótica em 595 nm e a morte bacteriana foi determinada pela contagem de UFC/mL. As amostras bacterianas utilizadas foram: *S. aureus* ATCC 25293- SA ATCC (A,B), *S. aureus* resistente a meticilina – MRSA (C, D) e *P. aeruginosa* ATCC 27853 - PA ATCC (E,F). Valores com $P \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

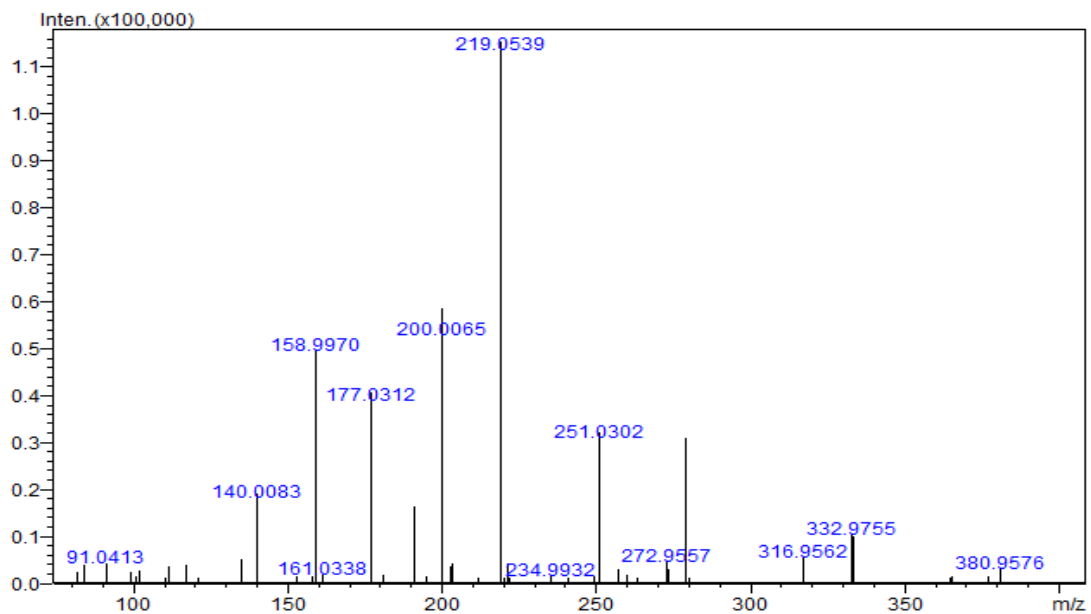
5.5 Caracterização molecular do soro de kefir 1

Para determinar o perfil molecular do soro de kefir 1 que apresentou atividade antimicrobiana, submetemos o soro a análise por SDS-PAGE Tris-Tricina eletroforese em gel 10 % e 16 %. O resultado em gel 10 % mostrou que o soro de kefir 1 apresenta três bandas, uma com massa entre 17 e 31 kDa, outra com massa maior do que 38 kDa e uma banda fraca abaixo de 12 kDa (Figura 11A). Uma vez que, a maior parte das moléculas com atividade antimicrobianas encontradas em leites fermentados possuem massa molecular pequena, majoritariamente abaixo de 10 kDa (MEISEL, 2005; GONZÁLEZ-OLIVARES et al, 2014) o soro de kefir foi separado nas seguintes frações moleculares cujo perfil de massa foi também determinado por SDS-PAGE Tris-Tricina: 1 – fração com massa acima de 10 kDa, 2 – Fração com massa abaixo de 10 kDa, 3 - Fração com massa acima de 1 kDa, 4 - Fração com massa abaixo de 1 kDa.

Os resultados mostraram que a fração com massa superior a 10 kDa apresenta duas bandas uma com massa entre 17 e 31 kDa e outra com massa superior a 38 kDa (Figura 11A). A fração molecular com massa acima de 1 kDa mostra um perfil molecular igual ao encontrado no soro do kefir (Figura 11A). Todavia, a fração molecular com massa menor do que 10 kDa em gel de 16 %, apresentou duas bandas, sendo uma com massa de aproximadamente 3.5 kDa e outra de aproximadamente 8,5 kDa (Figura 11B). No entanto, não foi observada nenhuma banda na fração com massa molecular abaixo de 1 kDa (Figura 11B). Essa fração foi então submetida a espectrometria de massa para determinar a massa das moléculas presentes nessa fração, os resultados mostraram que a massa das moléculas presentes nessa fração se encontram entre 91 e 400 Daltons (Figura 12).

Figura 11 - Caracterização molecular do soro de Kefir 1

Eletroforese em gel de Tricina-SDS-PAGE 10% (A) e 16 % (B) do Soro de kefir. (A) 1 – Padrão de Massa Molecular, 2 - Soro de kefir, 3 – Fração de massa molecular acima de 10 kDa; 4 – Fração de Massa molecular acima de 1 kDa; (B) – 1 Padrão de Massa Molecular, 2 – Fração Molecular de massa abaixo de 10 kDa, 3 – Fração de Massa Molecular abaixo de 1 kDa

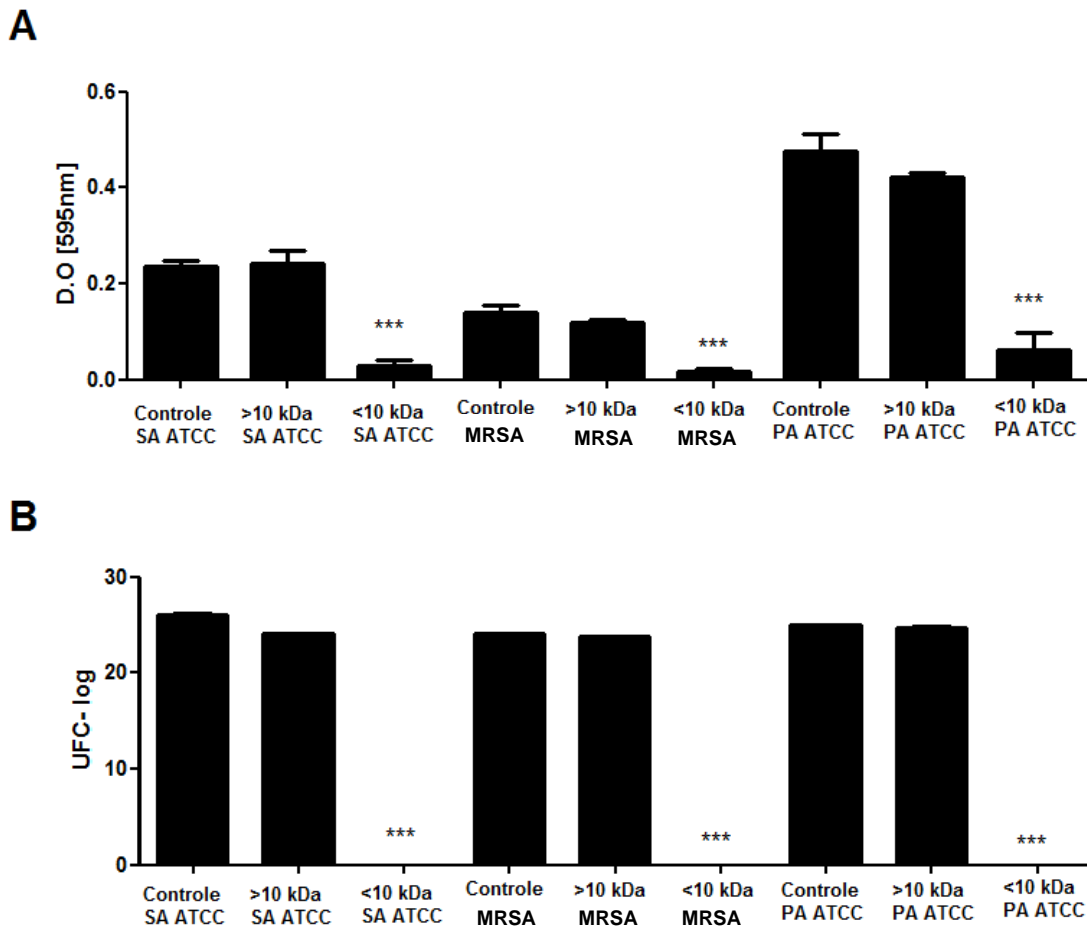
Figura 12 – Espectrometria de massa da fração Molecular de massa abaixo de 1 kDa

Fração molecular do soro de kefir 1 com massa abaixo de 1kDa analisada por espectrometria de massas, por injeção direta em um espectrômetro ESI-IT-ToF(Simadzu Co., Japão) equipado com sistema de cromatografia UFLC (20A Prominence, Shimadzu Co., Japão),

5.6 Efeito antimicrobiano das frações moleculares do soro de kefir 1.

Desde que, em pH 5 o soro de kefir foi bactericida contra todas as bactérias testadas, testamos a capacidade antimicrobiana das frações de soro de kefir com massa acima e abaixo de 10 kDa nesse pH. Como esperado, os resultados mostraram que a atividade antimicrobiana do soro de kefir se encontra na fração molecular com massa abaixo de 10 kDa (Figura 13).

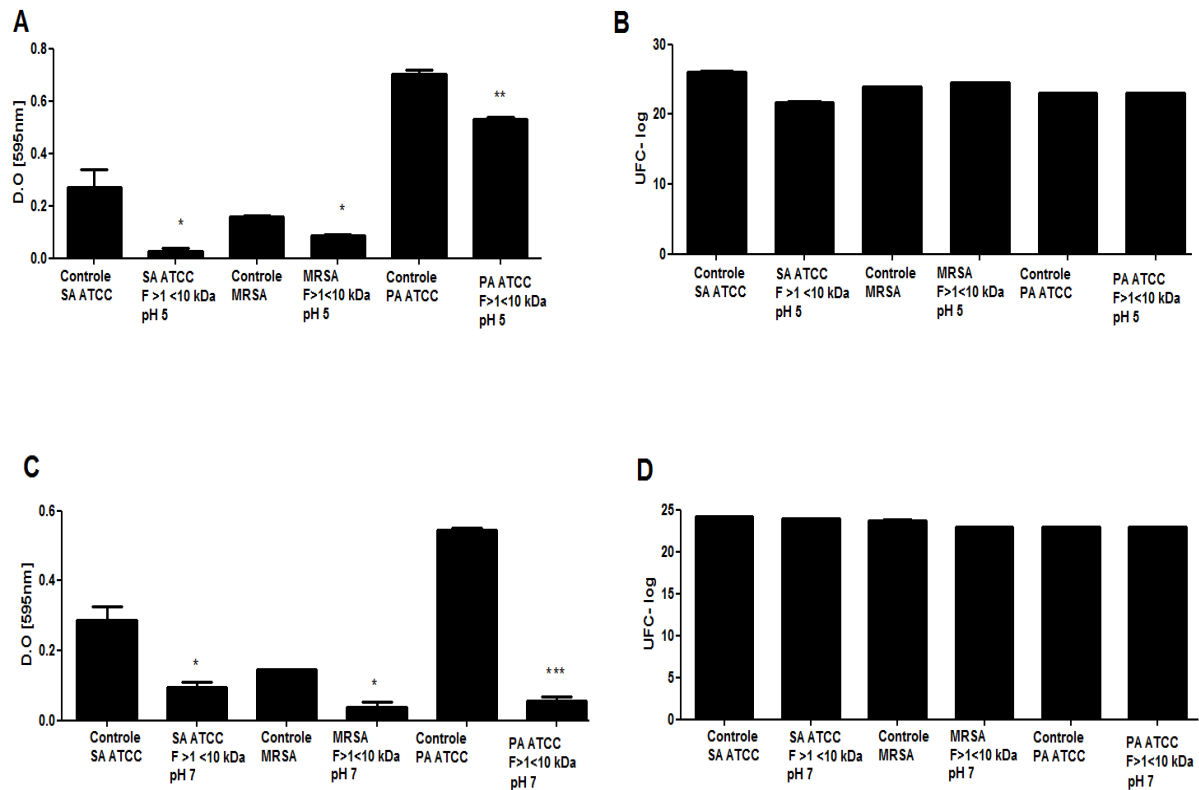
Figura 13- Atividade antimicrobiana das frações do soro de massa acima e abaixo de 10 kDa em pH 5



A capacidade das frações de massa acima e abaixo de 10 kDa de inibir a proliferação (A) e o número de Unidades Formadoras de Colônia - UFC/mL (B) foram determinadas após incubação das amostras bacterianas por 18 h a 37 °C na presença ou ausência das frações com massa maior ou menor que 10 kDa em pH 5. Para os controles, as bactérias foram incubadas com Meio Mueller Hinton (MH) diluído 1:2 em PBS em pH 5. O resultado da proliferação foi estabelecido pela leitura da densidade ótica em 595 nm e a morte bacteriana foi determinada pela contagem de UFC/mL. As amostras bacterianas utilizadas foram: *S. aureus* ATCC 25293- SA ATCC, *S. aureus* resistente a metilicina – MRSA e *P. aeruginosa* ATCC 27853 - PA ATCC. Valores com $P \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Desde que foi comprovado que as moléculas com atividade antimicrobiana presentes no soro de kefir possuem massa molecular abaixo de 10 kDa, decidimos verificar em qual fração molecular do kefir se encontrava as moléculas com atividade antimicrobiana, ou seja, na fração com massa abaixo de 1 kDa ou na fração com massa entre 1 kDa e 10 kDa, onde se encontram a maior parte das bacteriocinas. Para isso, dialisamos a fração molecular do kefir com massa abaixo de 10 kDa contra água destilada em membrana de poro de 1 kDa para eliminar as moléculas com massa inferior a 1 kDa e obter uma fração com massa entre 1 kDa e 10 kDa. A análise da atividade antimicrobiana da fração com massa entre 1 e 10 kDa mostrou que ela foi capaz de inibir a proliferação de *S. aureus*, MRSA e *P. aeruginosa* tanto em pH 5 quanto em pH7 (Figura 14 A e C). Todavia, não foi capaz de influenciar o número de UFCs dessas bactérias em nenhum pH, mostrando portanto, apenas efeito bacteriostático contra esses patógenos (Figura 14 B e D).

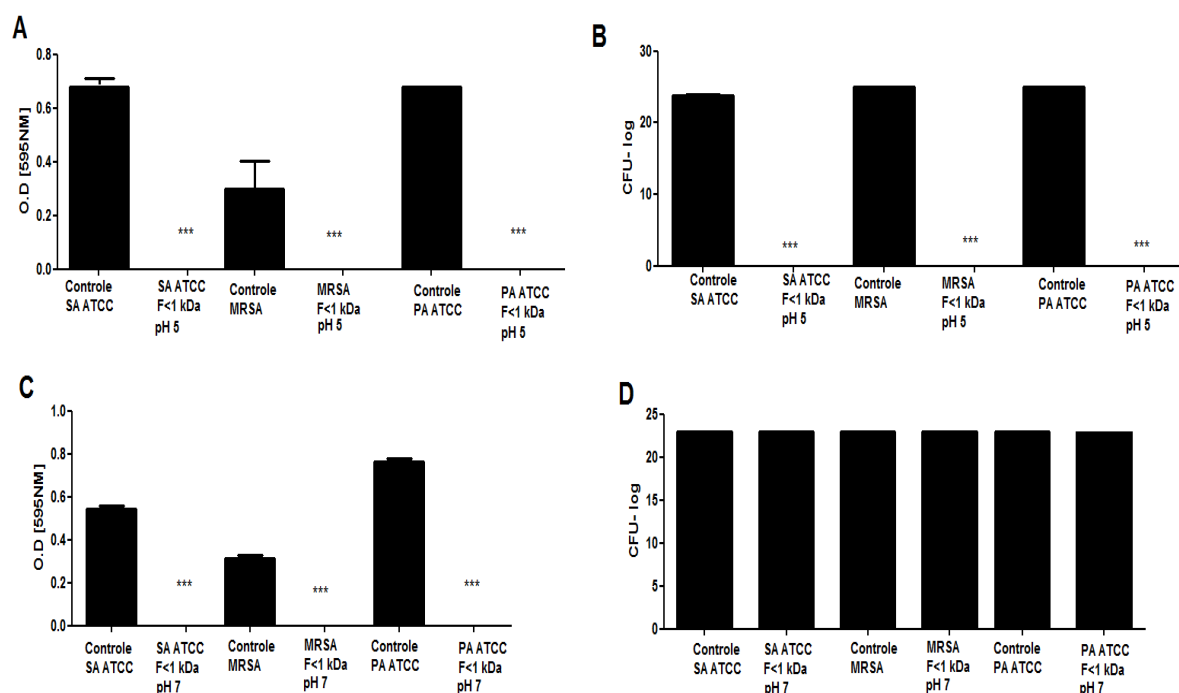
Figura 14- Atividade Antimicrobiana da Fração Molecular entre 1 kDa e 10 kDa em pH 5 e 7



A capacidade das frações com massa entre 1 e 10 kDa de inibir a proliferação (A,C) e o número de Unidades Formadoras de Colônia - UFC/mL (B,D) foram determinadas após incubação das amostras bacterianas por 18 h a 37 °C na presença ou ausência das frações com massa entre 1 kDa e 10 kDa em pH 5 e 7. Para os controles, as bactérias foram incubadas com Meio Mueller Hinton (MH) diluído 1:2 em PBS em pH 5 e 7. O resultado da proliferação foi estabelecido pela leitura da densidade óptica em 595 nm e a morte bacteriana foi determinada pela contagem de UFC/mL. As amostras bacterianas utilizadas foram: *S. aureus* ATCC 25293- SA ATCC, *S. aureus* resistente a meticilina – MRSA e *P. aeruginosa* ATCC 27853 - PA ATCC. Valores com $P \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Em contrapartida, os resultados obtidos com a fração molecular de massa abaixo de 1 kDa mostraram que essa fração é bactericida contra *S. aureus* ATCC, MRSA e *P. aeruginosa* em pH 5, ou seja, ela foi capaz de causar 100 % de morte bacteriana nesse pH. Todavia, em pH 7, a fração mostrou apenas efeito bacteriostático contra todas as amostras testadas desde que não influenciou no número de UFC dessas bactérias (Figura 15).

Figura 15- Atividade Antimicrobiana da Fração Molecular Abaixo de 1 kDa em pH 5 e 7



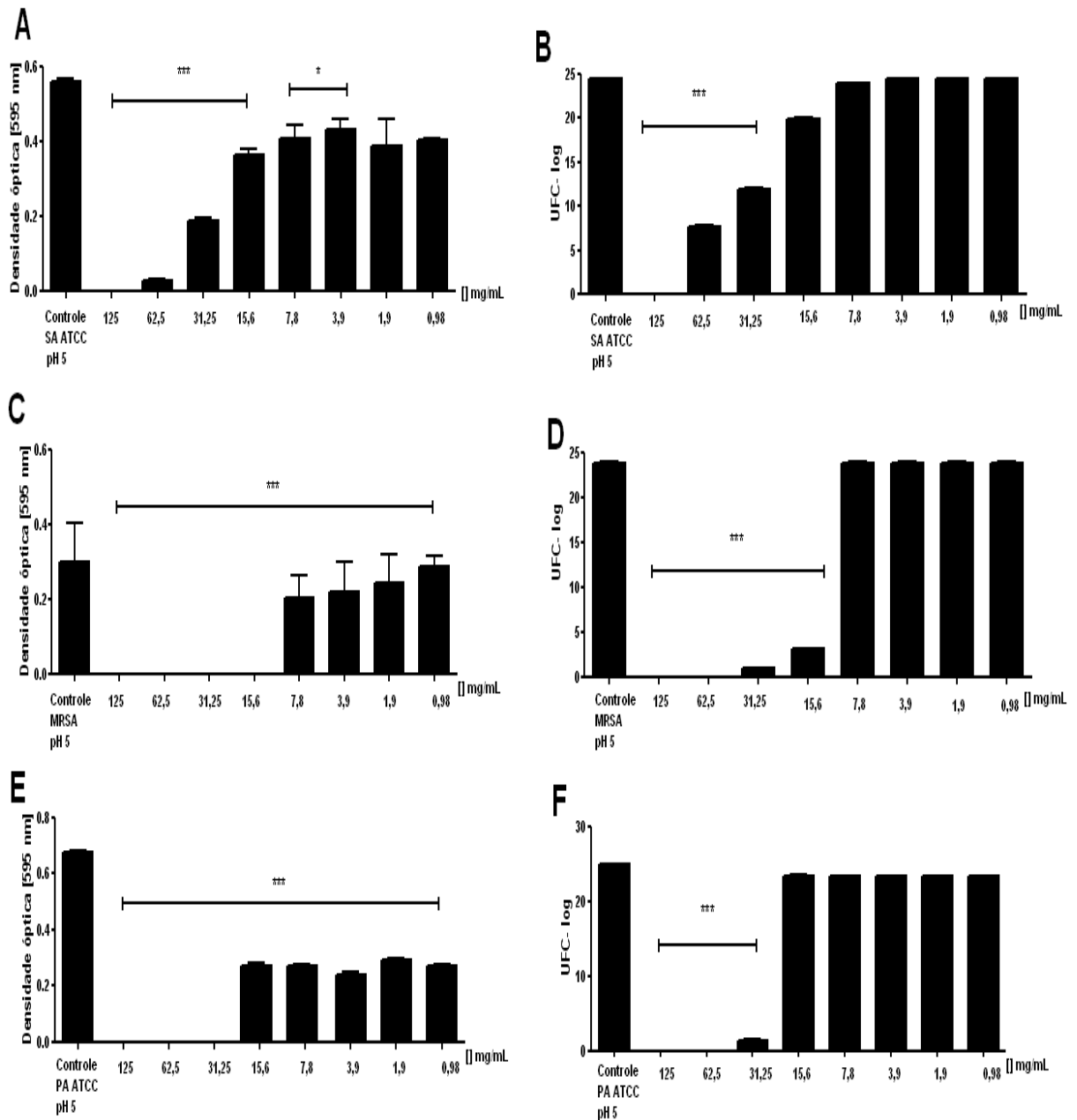
A capacidade da fração de massa menor que 1 kDa de inibir a proliferação (A,C) e o número de Unidades Formadoras de Colônia - UFC/mL (B,D) foram determinadas após incubação das amostras bacterianas por 18 h a 37 °C na presença ou ausência da fração com massa menor que 1 kDa em pH 5 e 7. Para os controles, as bactérias foram incubadas com Meio Mueller Hinton (MH) diluído 1:2 em PBS em pH 5 e 7. O resultado da proliferação foi estabelecido pela leitura da densidade ótica em 595 nm e a morte bacteriana foi determinada pela contagem de UFC/mL. As amostras bacterianas utilizadas foram: *S. aureus* ATCC 25293- SA ATCC, *S. aureus* resistente a meticilina – MRSA e *P. aeruginosa* ATCC 27853 - PA ATCC. Valores com $P \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5.7 Concentração inibitória mínima da Fração molecular de massa menor que 1 kDa

Uma vez que a fração de soro de kefir abaixo de 1 kDa apresentou melhor atividade antimicrobiana, determinamos a concentração inibitória mínima da fração contra *S aureus* ATCC, MRSA e *P aeruginosa* em pH 5 e 7.

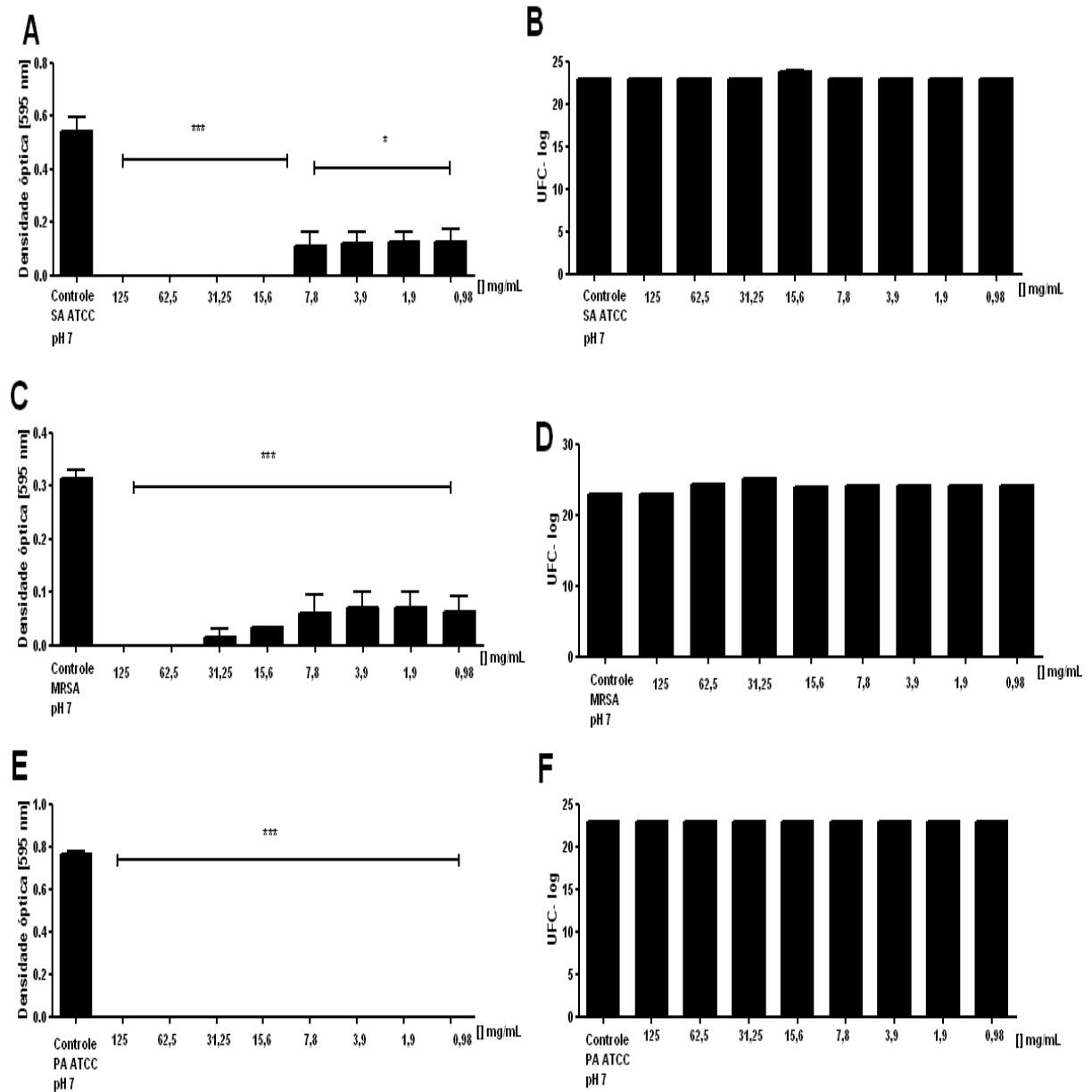
Os resultados demonstraram que a fração menor que 1 kDa em pH 5 é bactericida para MRSA até a concentração mínima de 15,8 mg/mL e para *S. aureus* ATCC e *P. aeruginosa* até a concentração mínima de 31,2 mg/mL (Figura 16). Em contraste, em pH 7, apesar de ser capaz de inibir a proliferação de todos os patógenos até a menor concentração testada de 0,98 mg / mL, a fração menor que 1 kDa não tem efeito bactericida mesmo na concentração mais alta utilizada que foi 125 mg/mL (Figura 17).

Figura 16- Concentração inibitória mínima da fração molecular do soro de kefir com massa menor do que 1 kDa em pH 5



A capacidade das concentrações da fração de massa menor que 1 kDa de inibir a proliferação (A,C,E) e o número de Unidades Formadoras de Colônia - UFC/mL (B,D,E) foram determinadas após incubação das amostras bacterianas por 18 h a 37 °C na presença ou ausência das diferentes concentrações da fração com massa menor que 1 kDa em pH 5. Para os controles, as bactérias foram incubadas com Meio Mueller Hinton (MH) em pH 5. O resultado da proliferação foi estabelecido pela leitura da densidade óptica em 595 nm e a morte bacteriana foi determinada pela contagem de UFC/mL. As amostras bacterianas utilizadas foram: *S. aureus* ATCC 25293- SA ATCC, *S. aureus* resistente a meticilina – MRSA e *P. aeruginosa* ATCC 27853 - PA ATCC. Valores com $P \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Figura 17- Concentração inibitória mínima da fração molecular do soro de kefir com massa menor do que 1 kDa em pH 7



A capacidade das concentrações da fração de massa menor que 1 kDa de inibir a proliferação (A,C,E) e o número de Unidades Formadoras de Colônia - UFC/mL (B,D,E) foram determinadas após incubação das amostras bacterianas por 18 h a 37 °C na presença ou ausência das diferentes concentrações da fração com massa menor que 1 kDa em pH 7. Para os controles, as bactérias foram incubadas com Meio Mueller Hinton (MH) em pH 5. O resultado da proliferação foi estabelecido pela leitura da densidade ótica em 595 nm e a morte bacteriana foi determinada pela contagem de UFC/mL. As amostras bacterianas utilizadas foram: *S. aureus* ATCC 25293- SA ATCC, *S. aureus* resistente a metilicina – MRSA e *P. aeruginosa* ATCC 27853 - PA ATCC. Valores com $P \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

6 DISCUSSÃO

O número crescente de bactérias multirresistentes, definidas como organismos resistentes a pelo menos um agente antimicrobiano de três classes quimicamente distintas, tornou-se uma das maiores ameaças à saúde global (FALAGAS; KOLETISI; BLIZIOTIS, 2006; MAGIORAKOS et al., 2012). A situação tornou-se tão grave que foi calculado que, se nada for feito no presente para combater esses patógenos, em 50 anos, eles matarão mais pessoas do que a cólera, o câncer, o tétano, acidentes de trânsito, sarampo, doenças diarreicas ou diabetes, sendo estimado que uma pessoa morrerá a cada três minutos por doenças infecciosas causadas por bactérias multirresistentes (O'NEILL, 2016).

Por esse motivo, o governo britânico em colaboração com outras organizações têm incentivado a comunidade científica a encontrar novos agentes antimicrobianos que possam substituir os antibióticos atuais que estão se tornando rapidamente ineficazes (COURTENAY et al., 2019). Todavia, o desenvolvimento de um novo componente com ação antimicrobiana é muito difícil, extremamente caro e envolve várias etapas até a comercialização do mesmo (JINKS, 2017). Isso faz com que o período entre a descoberta de um novo antimicrobiano até sua disponibilização no mercado seja longo, podendo levar cerca de 10 anos para que um novo antibiótico seja disponibilizado para utilização na rotina médica (JINKS, 2017).

Na tentativa de superar a barreira financeira gerada para encontrar e produzir novos agentes antimicrobianos, a indústria farmacêutica está testando a transposição de drogas já legalizadas, ou seja, está avaliando o efeito antimicrobiano de drogas já utilizadas legalmente contra outras doenças (UNIVERSITY OF CALIFORNIA, 2018). No entanto, a transposição de drogas pode causar efeitos colaterais indesejáveis que devem ser evitados. Por isso, vários grupos vêm utilizando em seus estudos, bactérias probióticas como provável fonte de produção de agentes antimicrobianos. As bactérias ácido-láticas são um dos grupos mais investigados por sua capacidade de produzir metabólitos secundários com atividade antimicrobiana, bacteriocinas e outros peptídeos antimicrobianos (SARANRAJ et al, 2013; AFOLAYAN; ADETOYE; AYENI, 2019). Além disso, essas bactérias têm demonstrado agir diretamente contra bactérias resistentes a antibióticos. Esse fato é bem representado pelo trabalho de Chen e colaboradores

(2019) que mostraram que após 24 horas de incubação concomitante de uma cepa de *E. coli* produtora de carbapenemase com diferentes linhagens de *Lactobacillus* o crescimento de *Escherichia coli* foi inibido. Outro estudo, realizado no Brasil, em Pelotas, RS, também mostrou que *Lactobacillus* derivados de grãos de kefir, quando cultivados simultaneamente com bactérias patogênicas como *E coli* O157:H7, *Salmonella*, *S aureus* e *L monocytogenes*, são capazes de inibir o crescimento dessas bactérias (DIAS; SILVA; TIMM, 2018).

No presente trabalho, mostramos que metabólitos produzidos pelos grãos de kefir do leite presentes no soro do kefir, também são capazes de inibir o crescimento de bactérias patogênicas como *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) e *P aeruginosa* (Figura 8). Todavia, a atividade antimicrobiana observada está diretamente associada com a origem dos grãos, desde que foram testados soros de kefir produzidos por grãos de origens diferentes e apenas um deles apresentou atividade antimicrobiana contra os patógenos testados (Figura 8). Os resultados obtidos pela avaliação da microbiota dos grãos por Sequenciamento 16S RNAr, mostraram que a microbiota associada aos dois tipos de grãos, são diferentes entre si (Figura 9), sugerindo que os microrganismos presentes nos grãos podem influenciar a atividade antimicrobiana do kefir produzido por eles. Por exemplo, a porcentagem da família *Streptococcaceae* é sete vezes maior nos grãos que produziram kefir com atividade antimicrobiana. Além disso, a porcentagem das bactérias das famílias *Pseudomonadaceae* e *Acetobacteraceae* é muito maior nos grãos produtores de kefir com atividade antimicrobiana, sendo respectivamente 16,86 e 8,7 vezes maior que a porcentagem de bactérias encontradas nos grãos produtores de kefir sem atividade antimicrobiana. Todavia, a família *Lactobacelacea* foi predominante em ambos os grãos compreendendo respectivamente 56,4 % e 94,43 % dos grãos que produzem kefir com e sem atividade antimicrobiana (Figura 9).

Quanto à atividade antimicrobiana do soro de kefir utilizado neste estudo, o fato do mesmo apresentar efeito bactericida contra *S. aureus*, MRSA e *P. aeruginosa* ATCC 27853 é muito importante uma vez que, esses patógenos juntamente com *Enterococcus faecium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acitobacter baumannii* e *Enterobacter* spp. são responsáveis pela maioria dos casos de infecções nosocomiais em todo o mundo (SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016). Por

isso, essas espécies foram apelidadas acronicamente pela comunidade científica de “ESKAPE group” (SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016).

No entanto, o efeito antimicrobiano do soro de kefir contra *S. aureus* e *P. aeruginosa* é dependente do pH (Figuras 8 e 10). Nesse sentido, foi observado que em pH 5 o soro de kefir é bactericida contra *S. aureus* ATCC 25923, MRSA, e *P. aeruginosa* ATCC 27853, mas em pH neutro ele tem efeito bactericida apenas contra as amostras de *S. aureus* (ATCC e MRSA) (Figuras 8 e 10). Todavia, apesar de não ser bactericida contra *P. aeruginosa* em pH 7, o soro de kefir nesse pH tem atividade bacteriostática contra essa bactéria (Figura 10). Vale ressaltar que o crescimento das bactérias apenas em meio de cultura em pH 5 foi equivamente ao crescimento obtido em pH7, sugerindo, portanto, que os efeitos observados são devido ao soro de kefir.

O efeito do pH em outros agentes antimicrobianos já está muito bem estabelecido, mostrando que cada agente antimicrobiano funciona melhor em determinado pH, que pode variar de ácido a básico, como por exemplo: ceftriaxona sódica pH 6.6, cloridrato de vancomicina o pH 3.48, metronidazol pH 4.96, penicilina pH 6 - 6,75, sulfato de amicacina pH 4,47, entre outros (MONTEIRO et al., 2012). Nesse sentido, além do pH do agente antimicrobiano, o pH do corpo que deverá utilizar o antimicrobiano como tratamento, também deve ser levado em consideração desde que ele pode variar de extremamente ácido (estômago) a neutro ou básico (KOZIOLEK et al., 2015). Conseqüentemente, avaliar como um agente antimicrobiano se comporta em determinado pH é essencial para que o mesmo possa ser transformado em um produto.

Outro fator importante a ser determinado sobre as moléculas com atividade antimicrobiana do kefir é o perfil molecular das mesmas. Sendo assim, o perfil molecular do soro de kefir e suas respectivas frações foi determinado por SDS-PAGE Tris-Tricina em gel de 10% (Figura 11). Os resultados mostraram que o perfil molecular do soro de kefir apresenta pelo menos três bandas distintas, uma com massa acima de 38 kDa, outra predominante com massa entre 17 e 30 kDa, e uma banda fraca com massa abaixo de 12 kDa (Figura 11). Esses resultados corroboram com os obtidos por El et al (2015) que submeteram o soro de kefir à SDS PAGE e encontraram bandas de aproximadamente 45 kDa, bandas entre 14 e 30 kDa e uma banda fraca abaixo de 6500 Daltons. No entanto, a análise das frações moleculares do kefir por Tris-Tricina eletroforese em gel de 16 % mostraram que existem duas

bandas na fração com massa abaixo de 10 kDa, sendo uma com massa de aproximadamente 8.5 kDa e outra com massa de aproximadamente 3.5 kDa (Figura 11B). Como esperado pela limitação técnica, não foi possível visualizar qualquer banda na fração molecular abaixo de 1 kDa (Figura 11). No entanto, os resultados de espectrometria de massa mostraram que as moléculas presentes na fração de massa molecular abaixo de 1 kDa possuem massa muito pequena entre 91 e 400 Da (Figura 12). Os resultados obtidos por espectrometria de massa também sugerem que o número de moléculas presentes nessa fração é menor do que 30, pois foi possível observar que todas as moléculas presentes receberam apenas uma carga em sua ionização, indicando que os sinais obtidos se referem a moléculas individuais e/ou fragmentação espontânea das mesmas (Figura 12).

A atividade antimicrobiana das frações do soro de kefir foi então avaliada contra as cepas de *S. aureus* ATCC 25923 e MRSA, e *P. aeruginosa* ATCC 27853. Como esperado, os resultados mostraram que a ação antimicrobiana do soro de kefir não estava na fração molecular acima de 10 kDa mas sim na fração abaixo de 10 kDa (Figura 13). Esses resultados corroboram com os dados da literatura científica, que mostram que a maior parte das moléculas com atividade antimicrobiana, como bacteriocinas e outros peptídeos antimicrobianos, possui massa menor do que 10 kDa (MARSHALL; ARENAS, 2003). Todavia, grande parte dos antibióticos usados atualmente possui massa muito pequena de aproximadamente 500 Daltons (ALTMAN, 2013). Conseqüentemente, os resultados obtidos nesse estudo indicam que as massas das moléculas com atividade antimicrobiana do soro de kefir estão entre as seguintes frações moleculares: fração com massa entre 1 e 10 kDa ou fração com massa abaixo de 1 kDa. Optamos então, por avaliar a propriedade antimicrobiana dessas frações moleculares. Considerando a importância do pH na atividade antimicrobiana, testamos o efeito de ambas frações em pH 5 e 7.

Os resultados mostraram que a fração do kefir com massa molecular abaixo de 1 kDa apresenta efeitos bactericida e bacteriostático, todavia, esses efeitos são dependentes do pH, desde que a fração é bactericida apenas em pH 5 e bacteriostática em pH 7 (Figura 15). O efeito bactericida dessa fração também depende da concentração da mesma, sendo bactericida para *S. aureus* ATCC 25923 e MRSA até a concentração mínima de 15,6 mg/mL e para *P. aeruginosa* até a concentração mínima de 31,2 mg/mL (Figura 16). No entanto, apesar de ser

bacteriostática contra todas as amostras testadas até a concentração mínima testada de 0,98 mg/mL, em pH 7 a fração não mostrou nenhum efeito bactericida contra os patógenos nem mesmo na mais alta concentração (Figura 17).

Vale a pena salientar que a resposta antimicrobiana obtida com o soro de kefir é diferente da resposta obtida com as frações isoladas do mesmo. Por exemplo, o soro de kefir teve efeito bactericida contra *S. aureus* ATCC 25923 e MRSA em pH 5 e 7 (Figura 8 e 10) todavia, esse efeito não foi observado na fração com massa menor que 1 kDa em pH 7 (Figura 15 e 17), e nem na fração molecular de massa entre 1 e 10 kDa que apresentou apenas efeito bacteriostático contra esses patógenos tanto em pH 5 quanto em pH 7 (figura 14). O efeito antimicrobiano obtido com a fração molecular de massa entre 1 e 10 kDa também foi diferente do encontrado no soro de kefir, pois diferentemente do soro, apresentou apenas efeito bacteriostático contra os patógenos testados tanto em pH 5 quanto em pH 7 (figura 14). As moléculas encontradas nessa fração, provavelmente se referem à bacteriocinas, como a SK-8 produzida por uma cepa de *Lactobacillus plantarum* isolada dos grãos de kefir. A bacteriocina SK-8, também possui massa molecular entre 1 e 10 kDa e apresenta apenas efeito bacteriostático (POWELL et al., 2007).

Um dado que vale a pena comentar sobre os resultados mostrados na figura 14, é o fato de que, apesar da fração molecular de massa entre 1 e 10 kDa ter demonstrado efeito bacteriostático, nenhuma diferença foi observada entre a UFC dos dados experimentais e dos dados obtidos com os controles (bactéria cultivada com meio na ausência da fração). Esses dados provavelmente estão relacionados ao fato das bactérias terem um crescimento acima do normal chegando a uma contagem de UFC de até 10^{35} . Sendo que nos testes realizados nesse estudo, a contagem de UFC foi apenas até 10^{24} , a diferença entre o controle e os dados experimentais não puderam ser observados no prazo de 18 horas de incubação. Todavia, quando as bactérias foram cultivadas em um intervalo de tempo menor (2 ou 4 horas), a diferença entre os dados experimentais e os dados de controle das UFC foi observada.

Outro fator importante a ser citado é que os resultados obtidos aqui sugerem que as moléculas presentes na fração molecular com massa menor do que 1 kDa não são relacionadas a ácidos nem álcoois, como descrito na maior parte dos estudos que atribuem as propriedades antimicrobianas do soro de kefir a esses compostos. Essa suposição está baseada no fato do kefir e sua fração

antimicrobiana poderem ser liofilizados, processo que elimina álcoois e a maior parte dos ácidos voláteis como ácido acético, ácido propiônico e cetonas, que são produtos encontrados na fermentação do kefir. Em acréscimo, resultados obtidos por ressonância magnética nuclear H1 e cromatografia de fase gasosa dessa fração mostraram que ela é composta na sua grande maioria por sequências de duplets e triplets de alanina, duplets de tirosina e açúcares, sendo eles: α -glicose, β -glicose e β -galactose (dados não mostrados). Além disso, a assinatura molecular obtida na ressonância magnética nuclear é diferente de álcoois e ácidos (dados não mostrados).

Outro dado importante a respeito da fração antimicrobiana de massa molecular abaixo de 1 kDa observado em nosso laboratório é o fato da mesma não ser tóxica à células epiteliais humanas em pH 7, sendo que em seu pH natural é tóxica para células epiteliais humanas apenas em concentrações superiores às necessárias para induzir um efeito bactericida (dados não mostrados).

Em síntese, os dados obtidos nesse estudo mostraram que a atividade antimicrobiana do soro de kefir contra *S. aureus* ATCC 25923, MRSA e *P. aeruginosa* ATCC 27853 está relacionada com a origem e a microbiota presente nos grãos de kefir, desde que nem todos os grãos de kefir possuem essa atividade. Todavia, não podemos descartar a ideia de que ambas as amostras de kefir testadas possam apresentar atividade antimicrobiana contra outros patógenos como leveduras, parasitas e vírus. Isso se baseia no fato, do kefir ser um material extremamente complexo e no relato de vários estudos que indicam que o kefir apresenta vasta ação antimicrobiana contra diferentes grupos de microrganismos. Corroborando com esses relatos, estudos publicados anteriormente com a fração antimicrobiana de massa molecular menor do que 1 kDa apresentada nesse estudo, mostrou que essa fração também é capaz de inibir o efeito citotóxico do vírus Zika (DOMINGOS et al., 2017).

Além disso, os resultados também indicam, que o efeito do kefir como bebida pode ser diferente do efeito das moléculas isoladas do mesmo. Esse fato deve ser levado em consideração nos estudos que isolam moléculas e microrganismos do soro de kefir ou de seus grãos e tentam desvendar os mecanismos e os efeitos dos mesmos separadamente, esquecendo que os grãos de kefir e as moléculas produzidas pelo metabolismo de seu microbioma têm evoluído em simbiose por mais de 2000 anos (LEITE et al, 2012b).

Por fim, como a caracterização completa dos microrganismos presentes nos grãos estudados e a caracterização molecular individual de todos os componentes presentes na amostra de kefir produzida por eles demandam um tempo muito prolongado, esses fatores serão analisados futuramente.

7 CONCLUSÃO

- 1 – A propriedade antimicrobiana do soro de kefir contra *S aureus* ATCC 25923, MRSA e *P aeruginosa* ATCC 27853 depende da origem e da microbiota presente nos grãos de kefir.
- 2 – A ação antimicrobiana do soro de kefir contra *S aureus* ATCC 25923, MRSA e *P aeruginosa* ATCC 27853 varia de acordo com o pH.
- 3 – Os grãos de kefir do leite podem produzir soro de kefir com uma fração antimicrobiana de massa molecular abaixo de 1 kDa diferente de metabólitos secundários como ácidos, álcoois e cetonas.
- 4 – Os grãos de kefir do leite podem produzir moléculas com atividade bacteriostática de massa entre 1 e 10 kDa,
- 5 – As frações moleculares do soro de kefir com propriedades antimicrobiana quando isoladas do soro e testadas separadamente podem induzir uma ação diferente de quando incorporadas no kefir.

REFERÊNCIAS¹

AFOLAYAN, Ayorinde O.; ADETOYE, Adewale; AYENI, Funmilola A. Beneficial Microbes: Roles in the Era of Antimicrobial Resistance. **Antimicrobial Resistance - A Global Threat**, [s.l.], 2 maio 2019. IntechOpen. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.79635>.

ALTMAN, S.. Antibiotics present and future. **Febs Letters**, [s.l.], v. 588, n. 1, p.1-2, 16 nov. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2013.10.048>.

ATANASSOVA, M. et al. Microbiological Study of Kefir Grains. Isolation and Identification of High Activity Bacteriocin Producing Strains. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, [s.l.], v. 13, n. 1, p.55-60, jan. 1999. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/13102818.1999.10819019>.

BARON, Florence et al. Rapid and cost-effective method for micro-organism enumeration based on miniaturization of the conventional plate-counting technique. **Le Lait**, [s.l.], v. 86, n. 3, p.251-257, maio 2006. EDP Sciences. <http://dx.doi.org/10.1051/lait:2006005>.

BAUER, A. W. et al. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. **American Journal Of Clinical Pathology**. Washington, p. 493-496. ago. 1965.

BECK, N.k. et al. DEVELOPMENT OF A SPOT-TITER CULTURE ASSAY FOR QUANTIFYING BACTERIA AND VIRAL INDICATORS. **Journal Of Rapid Methods & Automation In Microbiology**, [s.l.], v. 17, n. 4, p.455-464, dez. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4581.2009.00182.x>.

BIOMERIEUX. **20 500**: Api STAPH. 2013. 8 p.

BOURRIE, B. C. T., WILLING, B. P., and COTTER, P. D. (2016). The Microbiota and Health Promoting Characteristics of the Fermented Beverage Kefir. **Front. Microbiol.** 7. doi: 10.3389/fmicb.2016.00647

CARVALHO, J.C.T. Fitoterápicos: anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas: **Tecmedd**. 2004

CEVIKBAS, A. et al. Antitumoural antibacterial and antifungal activities of kefir and kefir grain. **Phytother. Res.** v. 8, p.78-82. 1994.

CHEIRSILP, Benjamas et al. Co-production of functional exopolysaccharides and lactic acid by *Lactobacillus kefirianofaciens* originated from fermented milk, kefir. **Journal Of Food Science And Technology**, [s.l.], v. 55, n. 1, p.331-340, 29 out. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s13197-017-2943-7>

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

CHEN, Chi-chung et al. Antimicrobial Activity of Lactobacillus Species Against Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. **Frontiers In Microbiology**, [s.l.], v. 10, p.1-1, 18 abr. 2019. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2019.00789>.

CHEN, T.-h. et al. Microbiological and chemical properties of kefir manufactured by entrapped microorganisms isolated from kefir grains. **Journal Of Dairy Science**, [s.l.], v. 92, n. 7, p.3002-3013, jul. 2009. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2008-1669>.

CLSI-CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **M02-A12**: Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test. Wayne, 2015a.

CLSI-CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **M02-A8**: Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test. Wayne, 2015b.

CLSI-CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **M100-S27**: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27 ed. Wayne: Anvisa, 2017.

CLSI-CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **M26-A**: Methods for determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents, 1999.

CORONA, Onofrio et al. Characterization of kefir-like beverages produced from vegetable juices. **Lwt - Food Science And Technology**, [s.l.], v. 66, p.572-581, mar. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.11.014>.

COURTENAY, M. et al. Tackling antimicrobial resistance 2019–2024 – The UK's five-year national action plan. **Journal Of Hospital Infection**, [s.l.], v. 101, n. 4, p.426-427, abr. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2019.02.019>.

DIAS, Priscila Alves; SILVA, Daiani Teixeira; TIMM, Cláudio Dias. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE MICRORGANISMOS ISOLADOS DE GRÃOS DE KEFIR. **Ciência Animal Brasileira**, [s.i.], v. 19, 17 maio 2018.

DOMINGOS, Marta de Oliveira et al. Influence of a Kefir-Derived Antimicrobial Fraction on Zika Virus Cytopathic Effects and Lymphocyte Proliferation. **Juniper Online Journal Of Immuno Virology**, [s.l.], v. 2, n. 2, 7 jul. 2017. Juniper Publishers. <http://dx.doi.org/10.19080/jojiv.2017.02.555584>.

EDGAR, Robert C. et al. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. **Bioinformatics**, [s.l.], v. 27, n. 16, p.2194-2200, 23 jun. 2011. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btr381>.

EL, Sedef Nehir et al. In vitro digestibility of goat milk and kefir with a new standardised static digestion method (INFOGEST cost action) and bioactivities of the resultant peptides. **Food & Function**, [s.l.], v. 6, n. 7, p.2322-2330, 2015. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c5fo00357a>.

FALAGAS, M. E.; KOLETISI, P. K.; BLIZIOTIS, I. A. The diversity of definitions of multidrug-resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) *Acinetobacter baumannii* and

Pseudomonas aeruginosa. **Journal Of Medical Microbiology**, [s.l.], v. 55, n. 12, p.1619-1629, 1 dez. 2006. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.46747-0>.

FARNWORTH, ER, MAINVILLE ,I. Kefir -A Fermented Milk Product. *In: Farnworth, E. R. (2th ed.), Handbook of Fermented Functional Foods (2 ed)*. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, London, New York, p. 89-127. 2008

FONSECA, Tairacan Pereira da et al. Diversity of Bacterial Communities on Four Frequently Used Surfaces in a Large Brazilian Teaching Hospital. **International Journal Of Environmental Research And Public Health**, [s.l.], v. 13, n. 2, p.152-153, 22 jan. 2016. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph13020152>.

FONSECA, Tairacan Pereira da; PESSÔA, Rodrigo; SANABANI, Sabri. Molecular Analysis of Bacterial Microbiota on Brazilian Currency Note Surfaces. **International Journal Of Environmental Research And Public Health**, [s.l.], v. 12, n. 10, p.13276-13288, 22 out. 2015. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph121013276>.

GARROTE, Graciela L.; ABRAHAM, Analía G.; ANTONI, Graciela L. de. Inhibitory Power of Kefir: The Role of Organic Acids. **Journal Of Food Protection**, [s.l.], v. 63, n. 3, p.364-369, mar. 2000. International Association for Food Protection. <http://dx.doi.org/10.4315/0362-028x-63.3.364>.

GONZÁLEZ-OLIVARES, Luis Guillermo et al. Peptide separation of commercial fermented milk during refrigerated storage. **Food Science And Technology (campinas)**, [s.l.], v. 34, n. 4, p.674-679, dez. 2014. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1678-457x.6415>.

GULITZ, Anna et al. The microbial diversity of water kefir. **International Journal Of Food Microbiology**, [s.l.], v. 151, n. 3, p.284-288, dez. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.09.016>.

GUZEL-SEYDIM, Zeynep et al. Turkish kefir and kefir grains: microbial enumeration and electron microscobic observation+. **International Journal Of Dairy Technology**, [s.l.], v. 58, n. 1, p.25-29, fev. 2005. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-0307.2005.00177.x>.

HAMADY, Micah; LOZUPONE, Catherine; KNIGHT, Rob. Fast UniFrac: facilitating high-throughput phylogenetic analyses of microbial communities including analysis of pyrosequencing and PhyloChip data. **The Isme Journal**, [s.l.], v. 4, n. 1, p.17-27, 27 ago. 2009. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2009.97>.

HAMET, Maria Fernanda et al. Application of culture-dependent and culture-independent methods for the identification of *Lactobacillus kefirianofaciens* in microbial consortia present in kefir grains. **Food Microbiology**, [s.l.], v. 36, n. 2, p.327-334, dez. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2013.06.022>.

HERLEMANN, Daniel Pr et al. Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. **The Isme Journal**, [s.l.], v. 5, n. 10, p.1571-1579, 7 abr. 2011. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2011.41>.

HERTZLER, Steven R.; CLANCY, Shannon M.. Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. **Journal Of The American Dietetic Association**, [s.l.], v. 103, n. 5, p.582-587, maio 2003. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1053/jada.2003.50111>.

ISMAIEL, A. A., Ghaly, M. F., and El-Naggar, A. K. (2011). Milk Kefir: Ultrastructure, Antimicrobial Activity and Efficacy on Aflatoxin B1 Production by *Aspergillus flavus*. *Curr. Microbiol.* 62:1602-1609. doi: 10.1007/s00284-011-9901-9

JEONG, D., Kim, D. H., Kang, I. B., Kim, H., Song, K. Y., Kim, H. S., and Seo, K. H. (2017a). Characterization and antibacterial activity of a novel exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefirianofaciens* DN1 isolated from kefir. *Food Control* 78:436-442. doi: 10.1016/j.foodcont.2017.02.033

JINKS, Tim. **Why is it so difficult to discover new antibiotics?** 2017. Disponível em: <<https://www.bbc.com/news/health-41693229>>. Acesso em: 27 out. 2017.

KIM, Dong-hyeon et al. Antimicrobial Activity of Kefir against Various Food Pathogens and Spoilage Bacteria. **Korean Journal For Food Science Of Animal Resources**, [s.l.], v. 36, n. 6, p.787-790, 31 dez. 2016. Korean Society for Food Science of Animal Resources. <http://dx.doi.org/10.5851/kosfa.2016.36.6.787>.

KIM, Dong-hyeon et al. Modern perspectives on the health benefits of kefir in next generation sequencing era: Improvement of the host gut microbiota. **Critical Reviews In Food Science And Nutrition**, [s.l.], v. 59, n. 11, p.1782-1793, 9 fev. 2018. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2018.1428168>.

KIM, O. et al. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [s.l.], v. 62, n. 3, p.716-721, 25 nov. 2011. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.038075-0>.

KOZIOLEK, M. et al. Intra-gastric pH and pressure profiles after intake of the high-caloric, high-fat meal as used for food effect studies. **Journal Of Controlled Release**, [s.l.], v. 220, p.71-78, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.10.022>.

LAUREYS, D.; VUYST, L. de. The water kefir grain inoculum determines the characteristics of the resulting water kefir fermentation process. **Journal Of Applied Microbiology**, [s.l.], v. 122, n. 3, p.719-732, 15 fev. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jam.13370>.

LAUREYS, David et al. Investigation of the instability and low water kefir grain growth during an industrial water kefir fermentation process. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 101, n. 7, p.2811-2819, 9 jan. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-016-8084-5>.

LEITE, A.m.o. et al. Assessment of the microbial diversity of Brazilian kefir grains by PCR-DGGE and pyrosequencing analysis. **Food Microbiology**, [s.l.], v. 31, n. 2, p.215-221, set. 2012a. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2012.03.011>.

LEITE, A.m.o. et al. Microbiological and chemical characteristics of Brazilian kefir during fermentation and storage processes. **Journal Of Dairy Science**, [s.l.], v. 96, n. 7, p.4149-4159, jul. 2013. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2012-6263>.

LEITE, Anely Machado de Oliveira et al. Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. **Brazilian Journal Of Microbiology**, [s.l.], v. 44, n. 2, p.341-349, 2012b. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1517-83822013000200001>

LIMA, Meire dos Santos Falcão de et al. Brazilian Kefir-Fermented Sheep's Milk, a Source of Antimicrobial and Antioxidant Peptides. **Probiotics And Antimicrobial Proteins**, [s.l.], v. 10, n. 3, p.446-455, 28 dez. 2017. Springer Nature America, Inc. <http://dx.doi.org/10.1007/s12602-017-9365-8>.

LONDERO, A. et al. Inhibitory Activity of Cheese Whey Fermented with Kefir Grains. **Journal Of Food Protection**, [s.l.], v. 74, n. 1, p.94-100, jan. 2011. International Association for Food Protection. <http://dx.doi.org/10.4315/0362-028x.jfp-10-121>

LOPITZ-OTSOA, Fernando et al. Kefir: una comunidad simbiótica de bacterias y levaduras con propiedades saludables. **Revista Iberoamericana de Micología**, [s.l.], v. 23, n. 2, p.67-74, jun. 2006. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1130-1406\(06\)70016-x](http://dx.doi.org/10.1016/s1130-1406(06)70016-x).

LTDA., **Cefar Diagnóstica**. SENSIFAR E MULTIFAR-CEFAR: DISCOS PARA ANTIBIOGRAMA. 2017.

MAGALHÃES, Karina Teixeira et al. Brazilian kefir: structure, microbial communities and chemical composition. **Brazilian Journal Of Microbiology**, [s.l.], v. 42, n. 2, p.693-702, jun. 2011. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1517-83822011000200034>.

MAGIORAKOS, A.-p. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology And Infection**, [s.l.], v. 18, n. 3, p.268-281, mar. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>.

MARSHALL, Sergio H.; ARENAS, Gloria. Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. **Electronic Journal Of Biotechnology**, [s.l.], v. 6, n. 3, 15 dez. 2003. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.2225/vol6-issue3-fulltext-1>.

MASELLA, Andre P et al. PANDAseq: paired-end assembler for illumina sequences. **Bmc Bioinformatics**, [s.l.], v. 13, n. 1, p.31, 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-13-31>.

MEISEL, Hans. Biochemical Properties of Peptides Encrypted in Bovine Milk Proteins. **Current Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 12, n. 16, p.1905-1919, 1 ago.

2005. Bentham Science Publishers Ltd..
<http://dx.doi.org/10.2174/0929867054546618>.

MICHELI, L. et al. Isolation and characterisation of a ropy Lactobacillus strain producing the exopolysaccharide kefiran. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 53, n. 1, p.69-74, 12 dez. 1999. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s002530051616>.

MONTEIRO, Cintia et al. Potencial hidrogeniônico de soluções de antibióticos submetidas a condições ambientais: ensaio preliminar. **Revista da Escola de Enfermagem da Usp**, [s.l.], v. 46, n. 2, p.311-319, abr. 2012. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0080-62342012000200007>.

MORELLI, Lorenzo; CAPURSO, Lucio. FAO/WHO Guidelines on Probiotics. **Journal Of Clinical Gastroenterology**, [s.l.], v. 46, p.1-2, out. 2012. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/mcg.0b013e318269fdd5>.

MORGAN, S.m. et al. Efficient method for the detection of microbially-produced antibacterial substances from food systems. **Journal Of Applied Microbiology**, [s.l.], v. 89, n. 1, p.56-62, jul. 2000. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01081.x>.

NIELSEN, Barbara; GÜRAKAN, G. Candan; ÜNLÜ, Gülhan. Kefir: A Multifaceted Fermented Dairy Product. **Probiotics And Antimicrobial Proteins**, [s.l.], v. 6, n. 3-4, p.123-135, 27 set. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12602-014-9168-0>.

O'NEILL, Jim. TACKLING DRUG-RESISTANT INFECTIONS GLOBALLY: FINAL REPORT AND RECOMMENDATIONS: THE REVIEW ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE. Londres: 2016. 84 p.

PEREZ, Rodney; PEREZ, Maria Teresa; ELEGADO, Francisco. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: A Review of Biosynthesis, Mode of Action, Fermentative Production, Uses, and Prospects. **International Journal Of Philippine Science And Technology**, [s.l.], v. 8, n. 2, p.61-67, 30 out. 2015. International Journal of Philippine Science and Technology. <http://dx.doi.org/10.18191/2015-08-2-027>.

PIPER, Clare et al. Discovery of Medically Significant Lantibiotics. **Current Drug Discovery Technologies**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.1-18, 1 mar. 2009. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/157016309787581075>.

POWELL, J.e. et al. Characterization of bacteriocin ST8KF produced by a kefir isolate Lactobacillus plantarum ST8KF. **International Dairy Journal**, [s.l.], v. 17, n. 3, p.190-198, mar. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.02.012>.

PROCÓPIO, Rudi Emerson de Lima et al. Antibiotics produced by Streptomyces. **The Brazilian Journal Of Infectious Diseases**, [s.l.], v. 16, n. 5, p.466-471, set. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2012.08.014>.

RANDAZZO, Walter et al. Development of new non-dairy beverages from Mediterranean fruit juices fermented with water kefir microorganisms. **Food Microbiology**, [s.l.], v. 54, p.40-51, abr. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2015.10.018>.

RATTRAY, F.P.; O'CONNELL, M.J. Fermented Milks Kefir. In: Fukay, J. W. (ed.), **Encyclopedia of Dairy Sciences (2th ed)**. Academic Press, San Diego, USA, p.518-524. 2011

RODRIGUES, Kamila Leite et al. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. **International Journal Of Antimicrobial Agents**, [s.l.], v. 25, n. 5, p.404-408, maio 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2004.09.020>.

ROSA, Damiana D. et al. Milk kefir: nutritional, microbiological and health benefits. **Nutrition Research Reviews**, [s.l.], v. 30, n. 1, p.82-96, 22 fev. 2017. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s0954422416000275>.

SANTAJIT, Sirijan; INDRAWATTANA, Nitaya. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. **Biomed Research International**, [s.l.], v. 2016, p.1-8, 2016. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/2475067>.

SANTOS, A. et al. The Antimicrobial Properties of Different Strains of Lactobacillus spp. Isolated from Kefir. **Systematic And Applied Microbiology**, [s.l.], v. 26, n. 3, p.434-437, jan. 2003. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1078/072320203322497464>.

SARANRAJ, P.; NAIDU, M.a.; SIVASAKTHIVELAN, P.. Lactic Acid Bacteria and its Antimicrobial Properties: a review. **International Journal Of Pharmaceutical & Biological Archives**, India, v. 6, n. 4, p.1124-1133, dez. 2013.

SCHÄGGER, Hermann. Tricine–SDS–PAGE. **Nature Protocols**, [s.l.], v. 1, n. 1, p.16-22, 12 maio 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2006.4>.

SHAM, Ashwag Yosef; ALMASRI, Abdulhadi. Bacteriostatic and Bactericidal Activity of Deer Musk on Multidrug Resistance Bacteria. **Pakistan Journal Of Biological Sciences**, [s.l.], v. 21, n. 7, p.331-339, 1 jul. 2018. Science Alert. <http://dx.doi.org/10.3923/pjbs.2018.331.339>.

SHARIFI, Mohammadreza et al. Kefir: a powerful probiotics with anticancer properties. **Medical Oncology**, [s.l.], v. 34, n. 11, 27 set. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s12032-017-1044-9>.

SILVA, Karoline R. et al. Antimicrobial Activity of Broth Fermented with Kefir Grains. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, [s.l.], v. 152, n. 2, p.316-325, 29 jul. 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-008-8303-3>.

TAKANO, T. Anti-hypertensive activity of fermented dairy products containing biogenic peptides. **Antonie van Leeuwenhoek** 82, 333–340, 2002.

ULUSOY, B. H. et al. An in vitro study on the antibacterial effect of kefir against some food-borne pathogens. **Turk Mikrobiyol Cem Derg.** n. 37, p.103-107. 2007.

University of California - Los Angeles. **8,000 new antibiotic combinations are surprisingly effective:** Grouping 4 or 5 existing medications could help slow antibiotic-resistant bacteria. 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedaily.com/releases/2018/09/180903101555.htm>>. Acesso em: 09 nov. 2018.

WESCHENFELDER, S; WIEST, J.M; CARVALHO, H.H.C. Atividade anti-escherichia coli em kefir e soro de kefir tradicionais. **Rev. Inst. Latic. "cândido Tostes"**. Rio Grande do Sul, p. 48-55. jun. 2009.

WITTHUHN, R Corli; SCHOEMAN, Tersia; BRITZ, Trevor J. Isolation and characterization of the microbial population of different South African kefir grains. **International Journal Of Dairy Technology**, [s.l.], v. 57, n. 1, p.33-37, fev. 2004. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-0307.2004.00126.x>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. Geneva, 2017.

ZUBILLAGA, Marcela et al. Effect of probiotics and functional foods and their use in different diseases. **Nutrition Research**, [s.l.], v. 21, n. 3, p.569-579, mar. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0271-5317\(01\)00281-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0271-5317(01)00281-0).

APÊNDICE A- SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S RNAr

Todas as análises feitas nos grãos de kefir utilizaram a base de dados EzBioCloud.

1. Contagem de leituras

O número de leituras foi calculado após a utilização de um pré-filtro, para a remoção das leituras com qualidades baixas ou comprimentos curtos, obtidas pelos dados brutos produzidos pela plataforma de sequenciamento NGS. Este número foi de 17,601. A partir destas leituras, os amplicons não específicos e as quimeras foram removidos, e o número total de leituras válidas utilizadas para a análise de dados foi de 16,151 (91,8%).

2. Comprimento das leituras

O comprimento utilizado foi de mínimo de 325pb, máximo de 558pb e uma média de 419.8pb.

3. Atribuição Taxonômica

O número de leituras identificadas a nível de espécie foi de 15,996 (99.0%) através do banco de dados EzBioCloud. Foi utilizado um cutoff de 97% de similaridade à nível de espécie, indicando a cobertura taxonômica desse banco de dados. Um total de 29 espécies únicas foram identificadas utilizando banco de dados de referência.

4. Diversidade alfa

Método de agrupamento e contagem de unidades taxonômicas operacionais (OTUs): CL_OPEN_REF_UCLUST_MC2

Cada leitura é identificada a nível de espécie contra uma bases de dados de referência com um dado cutoff de similaridade, geralmente o mais utilizado para bactérias é de 97%. As leituras que estão abaixo deste cutoff são compiladas e o

UCLUST é utilizado para executar novamente um agrupamento gerando assim OTUs adicionais. As OTUs são um grupo de sequências agrupadas por similaridade e essa estratégia é chamada de separação de OTU de referência aberta. Finalmente, as OTUs com leituras únicas são omitidas de análises posteriores.

A contagem de OTUs encontradas na amostra foi de 36. Pelo fato de que muitas espécies de bactérias exibem similaridade de sequência maior que 97% com outras espécies esse valor não equivale necessariamente ao número real de espécies diferentes. Ele representa o número de OTUs observado durante a experimentação, e pode ser diferente do número total de OTUs (riqueza de espécies) na amostra.

*uclust:http://drive5.com/usearch/manual/uclust_algo.html

* cdhit : <http://www.bioinformatics.org/cd-hit/>

A cobertura da biblioteca de Good (1953) foi de 100%. Este é um índice da extensão em que o número de leituras de sequenciamento usadas para análise representa a população real de espécies da amostra. O valor pode variar de 0 a 100%, onde 100% indica uma amostragem completa de espécies, ou seja, que é improvável que o sequenciamento adicional encontre mais espécies novas.

5. Índice de diversidade

Os índices de diversidade são medidas da diversidade de espécies, com base no número e padrão de OTUs observados na amostra. Os índices incluem estimativas de estatísticas de riqueza de espécies (Ace, Chao, Jackknife) e estimativas de uniformidade de espécies (Shannon, Simpson, NPS Shannon).

ACE e Chao 1 são indicadores de riqueza de espécie (número total de espécies na amostra) sensível a OTUs raras. Valores altos indicam maior diversidade.

ACE: LCI = 36.1 Valor = 45.4 HCI = 61.6

Chao 1: LCI = 36.6 Valor = 39.1 HCI = 51.9

Jackknife é um indicador de riqueza de espécie (número total de espécies na amostra) sensível a OTUs raras assim como OTUs abundantes. Valores altos indicam maior diversidade

LCI = 44.0 Valor = 44.0 HCI = 44.0

Shannon é um indicador de uniformidade de espécies (distribuição proporcional do número de cada espécie em uma amostra) que exibe valores maiores que 0 (valores altos indicam maior diversidade, e o valor máximo é alcançado quando todas as espécies estão presentes em números iguais)

$$\text{LCI} = 1.378 \quad \text{Valor} = 1.395 \quad \text{HCI} = 1.411$$

Simpson é um indicador de uniformidade de espécies que exibe a probabilidade de que duas sequências selecionadas aleatoriamente sejam da mesma espécie. Os valores variam de 0 a 1, e valores mais baixos indicam maior diversidade.

$$\text{LCI} = 0.328 \quad \text{Valor} = 0.333 \quad \text{HCI} = 0.338$$

NPS Shannon é um indicador de uniformidade de espécies que estima a diversidade quando existem espécies e abundância desconhecida. Os valores são maiores que 0 e os valores mais altos indicam maior diversidade.

Valores = 1.399

6. Hierarquia taxonômica

Bactéria = 16151

Classificação de acordo com o filo:

- Firmicutes 9378: A família mais detectada foi Lactobacillaceae (9109), e as espécies mais detectadas foram o grupo *Lactobacillus kefiranofaciens* (7790), seguido pelo grupo *Lactobacillus buchneri* (1199)
- Proteobacteria 6773: A família mais detectada foi Acetobacteraceae (4735), na qual a espécie mais detectada foi o grupo *Acetobacter pasteurianus* (4490). A segunda família mais detectada nesse filo foi a pseudomonadaceae (1898), na qual a espécie mais detectada foi o grupo *Pseudomonas putida* (1750).

7. Referências

BURNHAM, K. P.; OVERTON, W. S.. Robust Estimation of Population Size When Capture Probabilities Vary Among Animals. **Ecology**, [s.l.], v. 60, n. 5, p.927-936, out. 1979. Wiley. <http://dx.doi.org/10.2307/1936861>.

CHAO, Anne. Estimating the Population Size for Capture-Recapture Data with Unequal Catchability. **Biometrics**, [s.l.], v. 43, n. 4, p.783-786, dez. 1987. JSTOR. <http://dx.doi.org/10.2307/2531532>.

CHAO, Anne; LEE, Shen-ming. Estimating the Number of Classes via Sample Coverage. **Journal Of The American Statistical Association**, [s.l.], v. 87, n. 417, p.210-217, mar. 1992. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/01621459.1992.10475194>.

CHAO, Anne; SHEN, Tsung-jen. Nonparametric estimation of Shannon's diversity index when there are unseen species in sample. **Environmental And Ecological Statistics**, [s.l.], v. 10, n. 4, p.429-443, 2003. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1026096204727>.

GOOD, I. J.. THE POPULATION FREQUENCIES OF SPECIES AND THE ESTIMATION OF POPULATION PARAMETERS. **Biometrika**, [s.l.], v. 40, n. 3-4, p.237-264, 1953. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/biomet/40.3-4.237>.

Magurran, A. E. (2013). Measuring biological diversity. John Wiley & Sons.

scientific reports



OPEN

A new class of antimicrobial molecules derived from kefir, effective against *Pseudomonas aeruginosa* and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains

Vaniky Duarte Marques¹, Marcia Regina Franzolin¹, Sabri Saeed Sanabani², Hugo Vigerelli^{3,7}, Roxane Maria Fontes Piazza¹, Daniel Carvalho Pimenta³, Tiago Venâncio⁴, Irys Viana Neves¹, Herbert Guimarães de Sousa Silva¹, Daniella dos Santos Courrol¹, Lucia Mendonça-Previato⁵, José Osvaldo Previato⁵, Soraia Attie Calil Jorge⁶ & Marta de Oliveira Domingos^{1,5}