

## **Avaliação, *in vitro*, da atividade antimicrobiana da associação de metabólitos secretados dos simbióticos kefir e resveratrol, frente a microrganismos isolados de pacientes com infecção hospitalar**

**In vitro evaluation of the antimicrobial activity of the association of metabolites secreted from the symbiotics kefir and resveratrol, against microorganisms isolated from patients with hospital infections**

**Evaluación in vitro de la actividad antimicrobiana de la asociación de metabolitos secretados de los simbióticos kéfir y resveratrol, frente a microorganismos aislados de pacientes con infecciones hospitalarias**

Recebido: 01/11/2023 | Revisado: 10/11/2023 | Aceitado: 11/11/2023 | Publicado: 14/11/2023

**Sofia Vasconcelos Carneiro**

ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-1879-7176>

Faculdade de medicina de Itajubá, Brasil

E-mail: [sofiavscn@gmail.com](mailto:sofiavscn@gmail.com)

**Fernanda Braga**

ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-6443-1323>

Faculdade de medicina de Itajubá, Brasil

E-mail: [fernandabraga007@gmail.com](mailto:fernandabraga007@gmail.com)

**Marileia Chaves Andrade**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4496-7331>

Faculdade de medicina de Itajubá, Brasil

E-mail: [marileia.andrade@fmit.edu.br](mailto:marileia.andrade@fmit.edu.br)

### **Resumo**

As infecções hospitalares são consideradas um problema de saúde pública, com impacto crescente nas taxas de mortalidade e morbidade entre pacientes, e nos custos durante a assistência hospitalar. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a resistência antimicrobiana é considerada como uma das 10 principais ameaças globais à saúde pública e sua persistência é atribuída principalmente ao mau uso sistemático e abundante de antimicrobianos. Em uma análise de desenvolvimento clínico de antibióticos que atendem à ordem prioritária de patógenos resistentes à antibióticos, apenas seis antibióticos foram considerados promissores em 2019 pela OMS. As bactérias causadoras de infecções comuns, por sua vez, são o grupo que apresenta maiores taxas de resistência a antibióticos, o que justifica a urgência de alternativas terapêuticas. É nesse contexto que a indagação de novas alternativas naturais antimicrobianas se torna vantajosa. Este estudo tem como objetivo avaliar, *in vitro*, a atividade antimicrobiana da associação de metabólitos secretados dos simbióticos kefir e resveratrol, frente a bactérias isoladas de pacientes com infecção hospitalar.

**Palavras-chave:** Probióticos; Prebióticos; Crescimento bacteriano; Kefir; Resveratrol.

### **Abstract**

Hospital-acquired infections are considered a public health problem, with an increasing impact on mortality and morbidity rates among patients and on the costs associated with hospital care. According to the World Health Organization (WHO), antimicrobial resistance is seen as one of the top ten global threats to public health, with its persistence mainly attributed to the inappropriate and excessive use of antimicrobials. In a review of the clinical development of antibiotics aimed at priority resistant pathogens, only six antibiotics were deemed promising by the WHO in 2019. Bacteria causing common infections are the group with the highest antibiotic resistance rates, underscoring the urgency for therapeutic alternatives. It is in this context that the search for new natural antimicrobial alternatives becomes advantageous. This study aims to evaluate, *in vitro*, the antimicrobial activity of the combination of metabolites secreted from the probiotics kefir and resveratrol against bacteria isolated from patients with hospital-acquired infections.

**Keywords:** Probiotics; Prebiotics; Bacterial growth; Kefir; Resveratrol.

## Resumen

Las infecciones nosocomiales son consideradas un problema de salud pública, con un impacto creciente en las tasas de mortalidad y morbilidad entre pacientes y en los costos asociados con la atención hospitalaria. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la resistencia antimicrobiana es vista como una de las diez principales amenazas globales para la salud pública, y su persistencia se atribuye principalmente al uso inadecuado y excesivo de antimicrobianos. En un análisis sobre el desarrollo clínico de antibióticos dirigidos a patógenos resistentes prioritarios, solo seis nuevos antibióticos fueron considerados prometedores por la OMS en 2019. Las bacterias que causan infecciones comunes son el grupo con las tasas más altas de resistencia a antibióticos, lo que refuerza la urgencia de alternativas terapéuticas. Es en este contexto donde la búsqueda de nuevas alternativas antimicrobianas naturales se muestra ventajosa. Este estudio tiene como objetivo evaluar, *in vitro*, la actividad antimicrobiana de la combinación de metabolitos secretados de los simbióticos kéfir y resveratrol frente a bacterias aisladas de pacientes con infecciones nosocomiales.

**Palabras clave:** Probióticos; Prebióticos; Crecimiento bacteriano; Kéfir; Resveratrol.

## 1. Introdução

As infecções hospitalares são consideradas um problema de saúde pública, com impacto crescente nas taxas de mortalidade e morbidade entre pacientes, e nos custos durante a assistência hospitalar (Barros et al., 2012; Santos, 2004).

Caracterizada por qualquer processo infeccioso que se manifeste durante a permanência do paciente no hospital ou decorrente da hospitalização, as infecções hospitalares são influenciadas por variados fatores que incluem as características clínicas dos pacientes atendidos, a natureza dos procedimentos realizados e a tecnologia envolvida na assistência dos doentes de cada ambiente hospitalar. Além disso, as taxas de infecções hospitalares refletem substancialmente a qualidade do sistema de vigilância epidemiológica e a efetividade dos programas de controle e prevenção instaurados nesses ambientes (Santos, 2004; Turrini, 2002).

Em dados de 2019, o Ministério da Saúde estimou que a taxa de infecções hospitalares atinja 14% das internações no Brasil. Entre as vítimas destacam-se pacientes vulneráveis devido a condição de doente ou de imunossuprimidos que se encontram mais suscetíveis à infecções hospitalares, principalmente quando são submetidos a procedimentos invasivos. (Michelin et al., 2019).

Tendo em vista a propensão do ambiente hospitalar em albergar inúmeros microrganismos patogênicos ou não, é válido ressaltar a crescente ameaça às terapias anti infectivas: a resistência microbiana (Barros et al., 2012).

Com a descoberta da penicilina por Fleming em 1929, ocorreu uma intensa evolução farmacêutica no tratamento de infecções bacterianas e fúngicas. À medida que tais medicamentos foram globalizados, os microrganismos tornaram-se resistentes às drogas. Cenário que é, até hoje, agravado pelo uso desmedido, indiscriminado e prolongado de antimicrobianos, essencialmente antibióticos (Carreon et al., 2022; Michelin et al., 2018; Monika et al., 2020).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a resistência antimicrobiana é considerada como uma das 10 principais ameaças globais à saúde pública e sua persistência é atribuída principalmente ao mau uso sistemático e abundante de antimicrobianos. Em uma análise de desenvolvimento clínico de novos antibióticos que atendem à ordem prioritária de patógenos resistentes à antibióticos, apenas seis novos antibióticos foram considerados promissores em 2019 pela OMS. (WHO, 2022).

As bactérias causadoras de infecções comuns, por sua vez, são o grupo que apresenta maiores taxas de resistência a antibióticos, o que justifica a urgência de alternativas terapêuticas (Turrini, 2002). É nesse contexto que a indagação de novas alternativas naturais antimicrobianas se torna vantajosa (Monika et al., 2020).

O kéfir é constituído por um misto de bactérias e fungos, cultivados em leite caseiro, e sua característica particular que o difere de outros leites é seu fermento: os grãos de kéfir. Os grãos de kéfir quando introduzidos em meio à cultura como o leite, produzem ácido láctico, peptídeos, bioativos e antibióticos (Erdogan et al., 2019). Entre seus benefícios à saúde estão: a melhor digestão e tolerância a lactose, efeito antibacteriano, efeito hipocolesterolêmico, controle da glicose plasmática, efeito

anti hipertensivo, efeito anti inflamatório, atividade antioxidante, atividade anticancerígena e atividade antialérgica (Bengoa et al., 2019).

A produção de Kefir conta com a presença de *Lactobacillus kefirifaciens* e *Lactobacillus kefir*, dentre outros. Nos grãos de kefir, bactérias, principalmente bacilos, compõem a porção periférica. A porção interna do grão é constituída por leveduras e na interface das duas porções estão dispostas bactérias com filamentos longos de polissacarídeos, leveduras e fungos (Azizi et al., 2021). A microbiota presente no kefir desenvolve associações simbióticas complexas. As bactérias presentes produzem metabólitos que são utilizados pelas leveduras como fonte de energia. As leveduras por sua vez contribuem para as bactérias, ao produzirem fatores de crescimento, aminoácidos e vitaminas. (Rosa et al., 2017; Zanirati et al., 2015).

Para obtenção do kefir, os grãos inoculados no leite dependem da proporção e condições que sejam adequadas para iniciar o processo de fermentação (Marque et al., 2020). O processo de produção do kefir inclui a separação dos grãos, adição de leite aos grãos, fermentação dos grãos por 10 a 24 horas, separação por filtração do leite fermentado. Ao refrigerar o kefir a fermentação ocorre o que reduz o teor de lactose devido ao acúmulo de CO<sub>2</sub>, etanol e complexo vitamínico. Ao obter o leite fermentado, os grãos podem ser recuperados e utilizados em outra nova fermentação (Erginkaya et al., 2018).

O resveratrol é um antioxidante polifenólico presente em inúmeras plantas, como amendoim (*Arachis hypogea*), mirtilos e cranberries (*Vaccinium spp.*), knotweed japonês (*Polygonum cuspidatum*), e disponível para consumo humano principalmente em videiras (*Vitis vinifera*). À este composto são atribuídas propriedades anti carcinogênese, antienvhecimento e anti microbianas, as quais justificam sua recente manipulação como como nutracêutico (Singh et al., 2019).

O resveratrol é sintetizado por plantas em resposta a estresses, como ataque de fungos e irradiação ultravioleta (UV). Essa síntese é bem observada em cachos com uvas não infectadas que circundam uvas infectadas pelo fungo *Botrytis cinerea*. As uvas não infectadas sintetizam resveratrol em maior concentração a fim de conter a proliferação do fungo para uvas sadias. Tal produção, mediada por microrganismos, confere a esse metabólito características antifúngicas e pertencentes ao grupo das fitoalexinas naturais (Vestergaard et al., 2019).

Dentre as atividades antimicrobianas, o polifenólico tem efeito fungicida contra *Candida albicans*. Já a atividade antibacteriana abrange efeito bacteriostático ou bactericida contra variadas espécies bacterianas. As espécies afetadas pela ação bacteriostática do resveratrol são *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Listeria monocytogenes*. Em contraste, a ação bactericida atua contra *Propionibacterium acnes*, *Haemophilus ducreyi*, *Campylobacter spp.* e *Arcobacter spp* (Berman et al., 2017). Esse metabólito vem sendo amplamente manipulado na tentativa de investigar suas propriedades antimicrobianas como um agente único, ou na associação com antibióticos ou antifúngicos convencionais (Novelle et al., 2015). A associação do resveratrol com o kefir contra agentes antimicrobianos ainda é pouco explorada (Salehi et al., 2018).

Dado o exposto, objetivou-se para esse estudo a avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana da associação de metabólitos secretados da associação simbiótica do kefir e resveratrol, frente a microrganismos isolados de pacientes com infecção hospitalar.

## 2. Metodologia

Este estudo descritivo e quantitativo emprega a técnica de microdiluição em placa, utilizando o substrato fermentado de kefir associado ao resveratrol. Conforme destacado por Estrela (2018) em 'Metodologia Científica: Ciência, Ensino, Pesquisa', a escolha de técnicas apropriadas é fundamental para a validade dos resultados em pesquisas científicas.

A técnica de microdiluição é reconhecida por sua eficácia em determinar concentrações mínimas inibitórias, sendo ideal para este estudo que busca compreender as interações entre kefir e resveratrol. Esta abordagem assegura a precisão e

confiabilidade necessárias para estudos científicos, estando em consonância com os padrões metodológicos atuais (Estrela, 2018).

Como disposto na Tabela 1, as amostras selecionadas de *Proteus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas spp.*, *Hafnia alvei* e *Streptococcus pyogenes* são provenientes do Biobanco do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina de Itajubá e foram isoladas de pacientes hospitalizados no período de 2006 a 2008.

**Tabela 1** - Apresentação numérica das amostras bacterianas selecionadas e reavivadas que foram obtidas no biobanco do Laboratório de Microbiologia da FMIT.

CEPAS	N° DE AMOSTRAS SELECIONADAS	N° DE AMOSTRAS REAVIVADAS	N° DE AMOSTRAS NÃO REAVIVADAS
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	21	15	6
<i>Staphylococcus aureus</i>	14	8	6
<i>Streptococcus spp.</i>	19	11	8
<i>Serratia marcescens</i>	23	18	5
<i>Proteus spp.</i>	16	13	3
<i>Hafnia alvei</i>	12	5	7
<i>Pseudomonas spp.</i>	15	3	12

Fonte: Autores (2023).

É interessante observar na Tabela 1 que a cepa *Serratia marcescens* teve o maior número de amostras reativadas com sucesso. Em contraste, *Pseudomonas spp.* teve o maior número de amostras não reativadas. Estes dados podem indicar diferenças na viabilidade ou na capacidade de recuperação destas cepas sob condições específicas de armazenamento ou cultivo.

### Reativamento das amostras e plaqueamento das amostras viáveis

Em capela de fluxo laminar, após o procedimento de descongelamento, à temperatura ambiente, das amostras selecionadas, uma alíquota (aproximadamente 10 µL) de cada amostra foi transferida, com alça de repicagem, para meio de cultura caldo nutriente, e incubadas em estufa microbiológica por 48 horas a 37°C. A partir disso, foram selecionadas as amostras que obtiveram crescimento significativo, identificado pela turvação do meio de cultivo. As cepas com crescimento visível foram transferidas, assepticamente, com alça de repicagem para placas de Petri contendo ágar nutriente e incubadas em estufa microbiológica por 48 horas a 37°C. Após esse tempo, foi observado o crescimento das colônias, a contagem de UFC/mL (Unidades Formadoras de Colônias) e, em seguida, realizado coleta por meio de raspagem da massa bacteriana.

### Normatização do número de bactérias para utilização nos ensaios in vitro

Em capela de fluxo laminar, as cepas selecionadas foram coletadas com alça de repicagem das placas Petri, anteriormente descritas, e transferidas para tubos contendo 5 mL de solução salina estéril (0,85%). Esses microtubos foram vortezados para homogeneizar a suspensão e seguinte aferição da turbidez, por meio da densidade da suspensão empregando o cartão de Wickeman até atingir 3+ (quando ocorre o desaparecimento das linhas), que corresponde à escala 0,5 de McFarland,

correspondendo a aproximadamente  $10^8$  UFC/mL. Em seguida, cada amostra foi diluída para realização do experimento de análise da atividade antimicrobiana do simbiótico kefir e resveratrol em diferentes concentrações.

#### **Preparo dos grãos de kefir**

O leite pasteurizado foi colocado em um frasco esterilizado, onde posteriormente foram adicionados os grãos de kefir, deixados por um período de 20 horas para que ocorresse a fermentação. Em seguida, a amostra foi submetida a uma peneiração com microporos de 0,5mm para obtenção do filtrado fermentado denominado substrato metabólico de kefir.

#### **Preparo do resveratrol**

O resveratrol comercial liofilizado 1,500 mg (Trans-resveratrol, <sup>®</sup> Purity Labs) foi diluído na concentração de 1g/100mL em salina estéril e reservado a 4°C até o momento do uso.

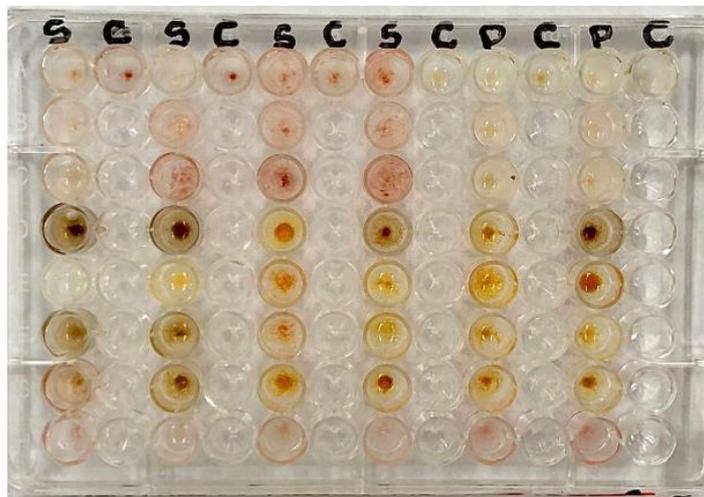
#### **Teste da atividade antimicrobiana do simbiótico pela microdiuição em placa**

Para a avaliação do efeito de produtos secretados do kefir em associação com o resveratrol na inibição do crescimento de cepas de bactérias patogênicas, foi utilizada a metodologia com microdiuição em placas como descrito a seguir (CLSI, 2023).

Com a pipeta Pasteur, foram colocados 40µL de caldo BHI (*Brains Heart Infusion*) em todos os poços utilizados da placa de ELISA (Figura 1). Em seguida, foram colocados 40 µL de extrato de kefir em concentrações de 40, 20 e 10% nas três primeiras fileiras. Logo após, foi colocado 40 µL de resveratrol e depois foi feita a associação de resveratrol e kefir a 40, 20 e 10% na quinta, sexta e sétima fileira respectivamente. Por último, foi adicionado 40 µL de antibiótico.

As placas foram deixadas incubando em estufa bacteriológica a 35°C, por 24 horas. Passadas as 24 horas, adicionamos 20 µL do revelador TTC (*Tetrazolim Chloride, Cloreto de Trifeniltetrazólico*) em todos os poços. O revelador é responsável por identificar o crescimento microbiano por aspectos colorimétricos. Feito isso, as placas foram colocadas em estufa biológica a 35°C por 3 horas. Decorrido esse tempo, realizamos a leitura das placas através da coloração obtida com o revelador TTC da seguinte maneira: coloração mais avermelhada/laranja: houve crescimento microbiano e cores amarelo escuro e amarelo claro: houve efeito inibitório sobre o crescimento microbiano.

**Figura 1** - Fotografia do teste de análise do extrato de kefir associado ao resveratrol na inibição do crescimento de cepas de *Serratia marcescens* e *Proteus mirabilis*, pela técnica de microdiluição em placas. Cada coluna possui uma amostra distinta e alternadamente está um controle positivo (solução salina estéril) para cada coluna de amostra. As três primeiras linhas contêm a concentração do extrato de kefir nas diluições de 40%, 20% e 10% respectivamente. A quarta linha contém o resveratrol isolado e as três linhas seguintes representam resveratrol associado às diluições de kefir, de 40%, 20% e 10%, respectivamente. A última linha contém o controle negativo (amoxicilina). A coloração avermelhada ou amarronzada evidencia o crescimento bacteriano intenso.



Fonte: Autores (2023).

Na Figura 1 podemos notar que alguns poços mostram uma coloração mais intensa, avermelhada ou amarronzada. Essa coloração sugere que em determinadas concentrações, o kefir, o resveratrol ou a combinação dos dois não foram completamente eficazes em inibir o crescimento da bactéria. A cepa *Serratia marcescens* é representada pelos poços marcados com 'S'. Podemos notar que alguns poços mostram uma coloração mais intensa, o que indica um crescimento bacteriano mais proeminente.

Os poços marcados com 'P' indicam a presença da cepa *Proteus mirabilis*. Comparando com os poços de *Serratia marcescens*, parece haver uma variação na intensidade da coloração, o que implica diferentes níveis de susceptibilidade à inibição pelo kefir e resveratrol. Poços mais claros em colunas 'S' e 'P' indicam uma inibição bem-sucedida do crescimento bacteriano, enquanto poços mais escuros sugerem uma menor eficácia do tratamento.

A comparação entre as colorações dos poços associados a cada cepa e os controles positivos fornece uma indicação visual do potencial antibacteriano dos tratamentos aplicados.

### Análise estatística dos dados

Os dados foram tabulados utilizando-se o programa Microsoft Excel 2020, para produção gráfica e interpretação descritiva dos resultados.

## 3. Resultados

As cepas bacterianas utilizadas neste estudo foram obtidas do Biobanco do Laboratório de Microbiologia da FMIT. Essas cepas foram isoladas de pacientes hospitalizados no período de 2006 a 2008 e abrangem uma variedade de clínica e demográfica de pacientes (Tabela 2). No entanto, é importante destacar que, devido à natureza retrospectiva do estudo e à falta de informações detalhadas sobre os pacientes e suas infecções, não é possível estabelecer uma relação direta entre a prevalência das cepas, o local de infecção e o perfil dos pacientes neste contexto específico.

**Tabela 2** - Relação de cepas bacterianas analisadas, incluindo dados como o sexo e idade dos pacientes, bem como o sítio de isolamento de cada amostra. Note que algumas lacunas não foram preenchidas devido à indisponibilidade de informações no acervo de pesquisa.

ESPÉCIE BACTERIANA	SEXO DO PACIENTE	IDADE DO PACIENTE	SÍTIO DE ISOLAMENTO
Proteus mirabilis 5208	M	75	-
Proteus mirabilis 15988	F	-	Urina
Proteus mirabilis 28831	F	1	Urina
Proteus mirabilis 3684	F	34	Líquidos e secreções
Proteus mirabilis 3726	M	63	Líquidos e secreções
Proteus mirabilis 4319	M	-	Líquidos e secreções
Proteus mirabilis 6231	F	65	Líquidos e secreções
Proteus mirabilis 3000	M	69	Líquidos e secreções
Proteus mirabilis 17011	F	78	Urina
Proteus mirabilis 21315	M	85	Urina
Proteus mirabilis 22414	M	82	Urina
Proteus mirabilis 4738	F	39	Líquidos e secreções
Proteus vulgaris 22399	F	3	Urina
Streptococcus pyogenes 3856	M	-	Líquidos e secreções
Streptococcus pyogenes 6296	M	12	-
Streptococcus pyogenes 3370	M	10	Líquidos e secreções
Streptococcus pyogenes 3774	F	8	Líquidos e secreções
Streptococcus pyogenes 6386	F	94	-
Streptococcus pyogenes 2848	M	15	Líquidos e secreções
Streptococcus pyogenes 3186	M	36	Líquidos e secreções
Streptococcus pyogenes 3587	F	71	-
Streptococcus pyogenes 9028	F	56	Urina
Streptococcus pyogenes 3497	M	17	-
Streptococcus pyogenes 29191	F	25	Urina
Staphylococcus aureus 10 A	-	-	-
Staphylococcus aureus 6330	M	83	-
Staphylococcus aureus 444	M	31	Hemocultura
Staphylococcus aureus 6543	M	-	Líquidos e secreções
Staphylococcus aureus 250	M	77	Hemocultura
Staphylococcus aureus 6552	M	76	Líquidos e secreções
Staphylococcus aureus 5554	F	63	-
Staphylococcus aureus 18635	F	84	Urina
Staphylococcus epidermidis 5568	M	64	-
Staphylococcus epidermidis 254	M	40	Hemocultura
Staphylococcus epidermidis 2714	F	25	Líquidos e secreções
Staphylococcus epidermidis 4298	M	-	Líquidos e secreções
Staphylococcus epidermidis 5440	M	-	-
Staphylococcus epidermidis 4873	-	Recém-nascido	Líquidos e secreções
Staphylococcus epidermidis 4181	F	67	Líquidos e secreções
Staphylococcus epidermidis 402	M	15	Hemocultura
Staphylococcus epidermidis 956	F	68	Hemocultura
Staphylococcus epidermidis 4989	M	48	Líquidos e secreções
Staphylococcus epidermidis 5518	M	81	Líquidos e secreções
Staphylococcus epidermidis 1147	M	-	Hemocultura
Staphylococcus epidermidis 4970	M	49	Líquidos e secreções
Staphylococcus epidermidis 330	F	-	Hemocultura
Staphylococcus epidermidis 5791	F	90	-
Serratia marcescens 6022	F	10	-
Serratia marcescens 5033	F	48	Líquidos e secreções
Serratia marcescens 25373	F	-	Urina
Serratia marcescens 5337	F	33	-
Serratia marcescens 777	F	14 dias	Hemocultura
Serratia marcescens 20124	M	76	Urina
Serratia marcescens 24795	M	-	Urina
Serratia marcescens 29641	M	66	Urina
Serratia marcescens 6119	F	16	-
Serratia marcescens 6132	F	12	-
Serratia marcescens 4754	F	4	Líquidos e secreções
Serratia marcescens 4929	F	-	Líquidos e secreções
Serratia marcescens 28239	M	-	Urina
Serratia marcescens 303	M	24	Hemocultura
Serratia marcescens 5324	M	80	-
Serratia marcescens 6287	F	51	Líquidos e secreções
Serratia marcescens 834	F	-	Hemocultura
Serratia marcescens 4810	M	25	Líquidos e secreções
Pseudomonas 4696	M	18 dias	Líquidos e secreções
Pseudomonas 29708	M	86	Urina
Pseudomonas 4516	F	-	Líquidos e secreções
Hafnia alvei 26479	M	-	Urina
Hafnia alvei 9957	M	-	Urina
Hafnia alvei 24167	M	74	Urina
Hafnia alvei 2868	M	38	Líquidos e secreções
Hafnia alvei 9779	F	52	Urina

Fonte: Autores (2023).

A Tabela 2 oferece observações válidas: o sítio de isolamento varia, sendo a urina e líquidos e secreções os mais comuns, o que pode indicar infecções associadas ao trato urinário ou infecções de feridas, respectivamente. A presença de *Streptococcus pyogenes* e *Staphylococcus aureus* em amostras de urina pode ser particularmente interessante, pois estes não são comumente associados a infecções urinárias, sugerindo talvez infecções secundárias ou casos clínicos incomuns. Além disso, a idade dos pacientes varia significativamente, o que pode ser relevante na análise de susceptibilidade a infecções e na eficácia do tratamento em diferentes faixas etárias. Essa análise é crucial para compreender padrões de infecção, resistência bacteriana e para aprimorar abordagens terapêuticas.

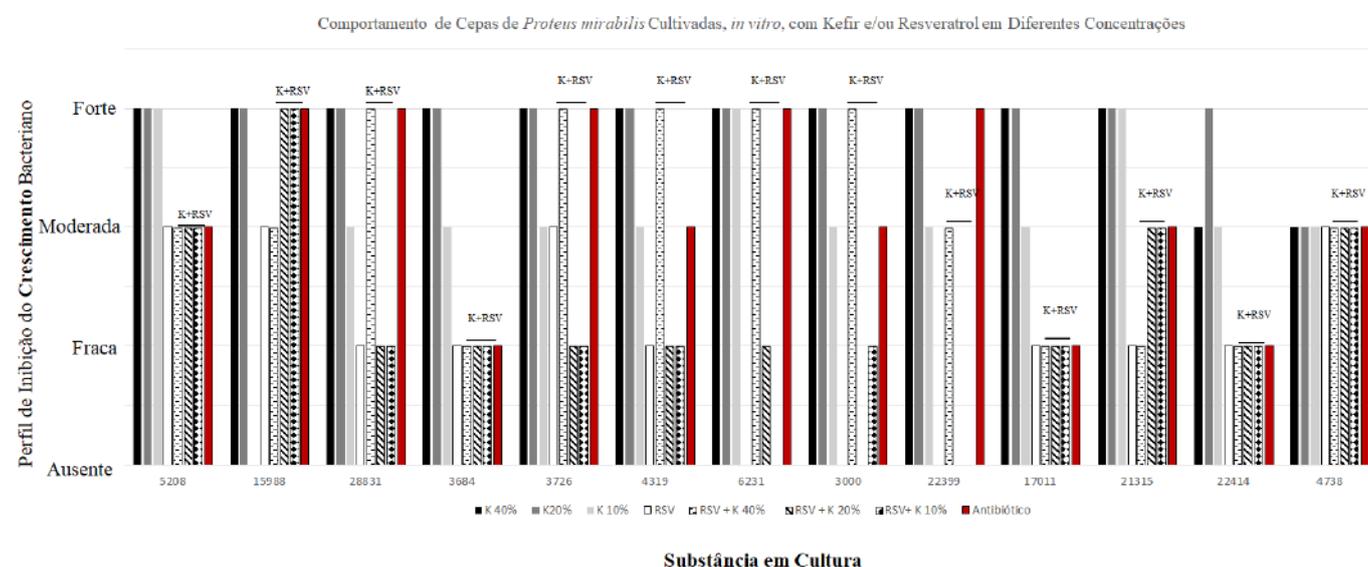
Nesta pesquisa, identificamos padrões distintos de inibição do crescimento bacteriano quando expostos ao kefir, resveratrol e à combinação de ambos, o que denominamos simbiótico. A eficácia das inibições variou conforme a concentração utilizada e a espécie bacteriana em questão. Devido à especificidade dos resultados para cada patógeno testado, descrevemos e analisamos os achados de maneira individualizada para cada espécie bacteriana.

### *Proteus spp.*

Nas cepas de *Proteus spp.* (Figura 2), o cultivo de kefir em concentração de 40% resultou em forte inibição do crescimento em 84,6% das cepas, e inibição moderada em 15,4%. Já o cultivo de kefir a 20% resultou em forte inibição do crescimento de 92,3, e moderada em 7,7%. Ao reduzir a concentração cultivada do kefir a 10%, houve forte inibição do crescimento em 23% das cepas. A maioria, cerca de 69%, apresentou inibição moderada, enquanto 8% resistiram completamente à ação do kefir.

Quando cultivado isoladamente, o resveratrol resultou na inibição fraca de 46%, na inibição moderada de 31%, e não exibiu efeito sobre 23% das cepas. A combinação do polifenólico com kefir a 40% mostrou resultados variados: 38,46% das cepas tiveram forte inibição, 30,76% apresentaram inibição moderada e outras 30,76% mostraram inibição fraca, indicando crescimento na presença do simbiótico. Em associação a concentrações de 20% e 10% de kefir, os resultados do resveratrol foram similares: 7,7% das cepas mostraram forte inibição, 23% moderada, 53,8% fraca e 15,4% sem inibição.

**Figura 2** - Comportamento de cepas de *Proteus spp.* cultivadas *in vitro* com diferentes concentrações de kefir e/ou resveratrol. As barras ilustram o nível de inibição do crescimento bacteriano, variando de ausente a forte, e as substâncias em cultura são detalhadas na parte inferior, demonstrando a eficácia relativa de cada inibição.



Fonte: Autores (2023).

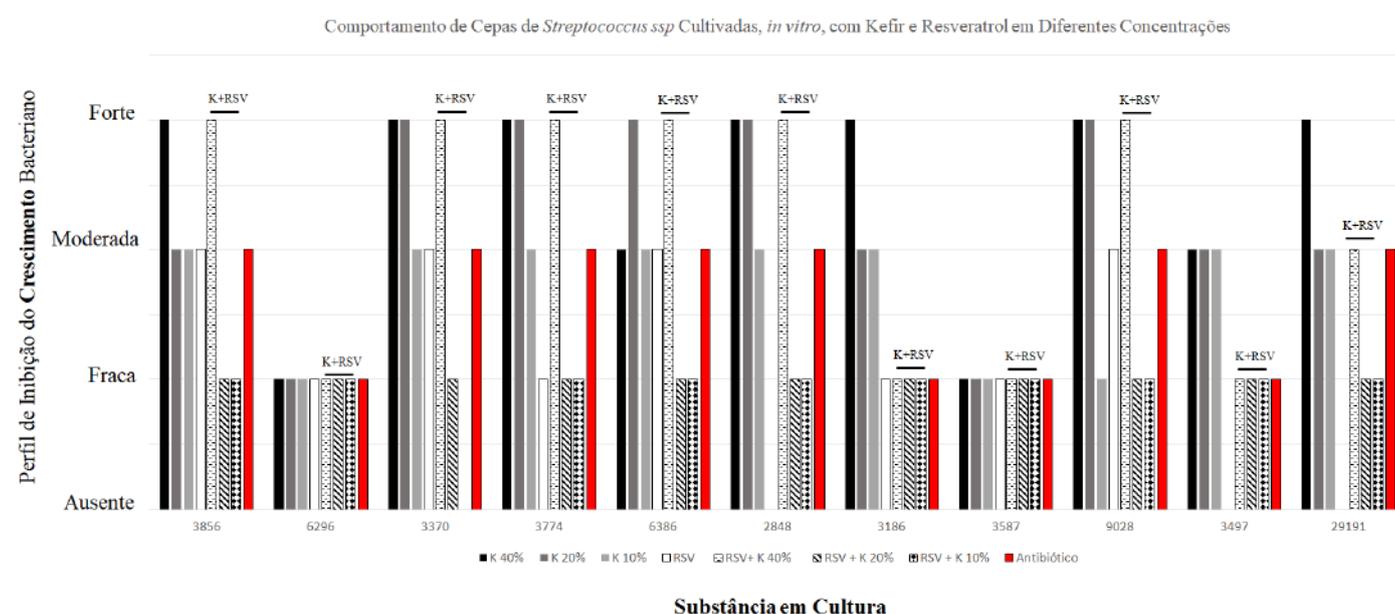
Na Figura 2, observe que cada conjunto de colunas representa uma cepa de *Proteus mirabilis*, identificada por um número específico. O padrão de preenchimento dentro de cada coluna indica o tipo de substrato testado: kefir (K) nas concentrações de 40%, 20% e 10%; resveratrol (RSV) sozinho ou em combinação com kefir em diferentes concentrações; e um controle de antibiótico. A altura de cada coluna reflete o grau de inibição do crescimento bacteriano exercido por cada substrato, onde colunas mais altas significam maior inibição e colunas mais baixas ou ausência de coluna indicam menor inibição. Isso permite uma comparação visual rápida do efeito inibitório de cada tratamento sobre as diferentes cepas.

### *Streptococcus pyogenes*

A análise das amostras de *Streptococcus pyogenes* (Figura 3) cultivadas *in vitro* com kefir a 40% revelou que 64% foram fortemente inibidas, enquanto as demais apresentaram inibição moderada ou fraca em proporções iguais de 18%. Na presença do kefir a 20%, 45,5% das amostras exibiram forte inibição, 36,4% tiveram uma inibição moderada e 18,2% mostraram fraca inibição. Em contraste, o kefir a 10% gerou um padrão mais consistente, com 72,7% das amostras apresentando inibição moderada e 27,3% fraca.

Ao avaliar o impacto isolado do resveratrol, observou-se um equilíbrio entre inibição moderada e fraca (ambas a 36,4%), com 27,3% das cepas não exibindo inibição. No entanto, quando combinado com o kefir a 40%, o resveratrol realçou a inibição, com 54,5% das linhagens fortemente inibidas, 36,4% fracamente e 9,1% moderadamente. Esta combinação, comparada ao kefir 40% isolado, sugere um reforço da inibição pelo resveratrol, evidenciado pelo aumento de linhagens fracamente inibidas. Por outro lado, a combinação de resveratrol e kefir a 20% mostrou diminuição na potência inibitória, pois 100% das linhagens tiveram inibição fraca. Com a concentração de resveratrol + kefir a 10%, 91% das amostras exibiram fraca inibição e 9% não foram afetadas, indicando uma possível atenuação da eficácia do kefir nesta concentração pela presença do resveratrol.

**Figura 3** - Comportamento de cepas de *Streptococcus pyogenes* quando cultivadas *in vitro* com diferentes concentrações de kefir e/ou resveratrol. As barras indicam o nível de inibição do crescimento bacteriano, desde ausente até forte. As substâncias aplicadas e suas concentrações são especificadas na base do gráfico, indicando a eficácia de cada uma.



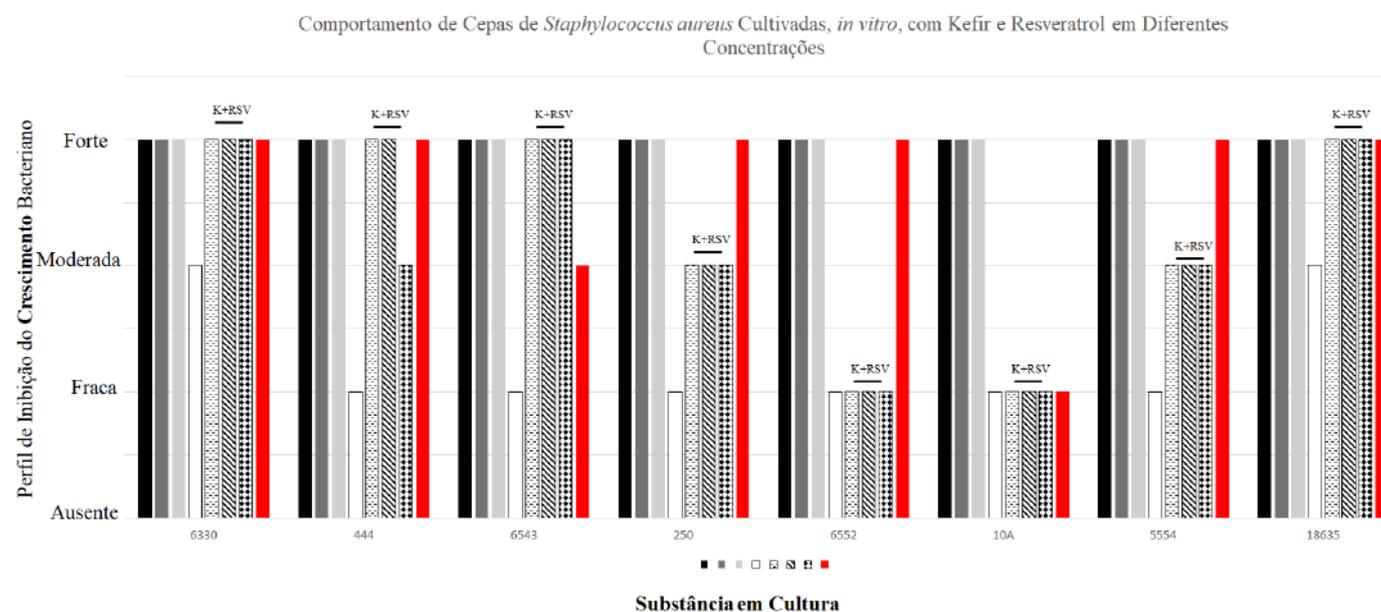
Fonte: Autores (2023).

Na representação gráfica da Figura 3, cada agrupamento vertical de barras corresponde a uma cepa distinta de *Streptococcus pyogenes*, que é distinguida por uma numeração única. As diferentes texturas nas barras representam variados tratamentos, incluindo kefir em três concentrações distintas (40%, 20% e 10%), resveratrol sozinho, ou a combinação de resveratrol com kefir, além de um padrão de antibiótico para referência. A escala vertical das barras é um indicativo direto do nível de inibição que cada tratamento impõe ao crescimento bacteriano: barras mais elevadas apontam para uma inibição mais significativa, enquanto barras mais curtas ou sua ausência sugerem uma eficácia menor.

### *Staphylococcus aureus*

Se tratando de *S. aureus* (Figura 4), interessantemente, 100% das cepas testadas apresentaram forte inibição frente o cultivo, *in vitro*, com todas as diferentes concentrações de kefir, 40%, 20% e 10%. O resveratrol isolado apresentou menor competência na inibição do crescimento de cepas de *S. aureus*, pois 75% das cepas foram fracamente inibidas, enquanto 25%, moderadamente. De maneira clara, o resveratrol impactou o potencial inibitório do kefir, pois quando associados, houve uma redução do potencial de inibição observado em diferentes concentrações do probiótico kefir em cultivo isolado. Por exemplo, a associação resveratrol + kefir a 40% e resveratrol + kefir a 20%, resultou em 50% das cepas com forte inibição do crescimento, 25% com moderada e 25% com fraca inibição. Quando se diminuiu a quantidade de kefir no simbiótico, resveratrol + kefir a 10%, o impacto modular do resveratrol no potencial inibitório do kefir foi ainda mais evidente, onde apenas 37,5% das cepas apresentaram forte inibição, 37,5% com moderada inibição e, 25% com crescimento fracamente inibido pelo simbiótico.

**Figura 4** - Comportamento de cepas de *Staphylococcus aureus* cultivadas *in vitro* com variadas concentrações de kefir e/ou resveratrol. O efeito inibidor sobre o crescimento bacteriano é ilustrado pelas barras, que vão de ausente a forte inibição. As substâncias e suas concentrações são detalhadas no eixo horizontal, refletindo a potência relativa de cada combinação.



Na Figura 4, observe que cada conjunto de colunas representa uma cepa de *Staphylococcus aureus*, identificada por um número específico. O padrão de preenchimento dentro de cada coluna indica o tipo de substrato testado: kefir (K) nas concentrações de 40%, 20% e 10%; resveratrol (RSV) sozinho ou em combinação com kefir em diferentes concentrações; e um controle de antibiótico. A altura de cada coluna reflete o grau de inibição do crescimento bacteriano exercido por cada

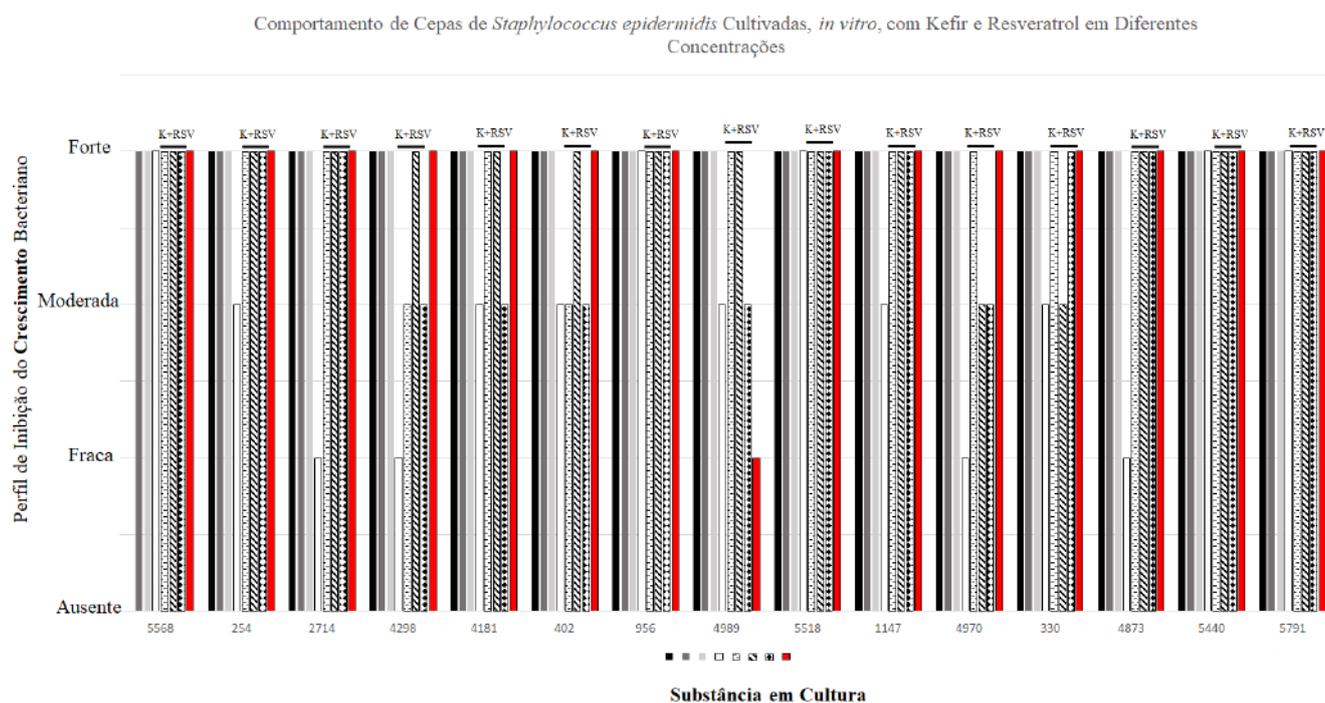
substrato, onde colunas mais altas significam maior inibição e colunas mais baixas ou ausência de coluna indicam menor inibição. Isso permite uma comparação visual rápida do efeito inibitório de cada tratamento sobre as diferentes cepas.

### *Staphylococcus epidermidis*

Resultados envolvendo *S. epidermidis* (Figura 5) em cultivo com kefir em concentrações de 40%, 20% e 10% demonstram uma inibição significativa do crescimento, afetando 100% das cepas testadas. Ao utilizar apenas o resveratrol, 40% das amostras manifestaram inibição moderada, 33,33% mostraram forte inibição, e 26,66% apresentaram inibição leve.

A associação de resveratrol com kefir a 40% proporcionaram predominantemente uma forte inibição em 86,6% e uma inibição moderada em 13,3% das cepas. Esta proporção se manteve mesmo ao diminuir a concentração de kefir para 20% na combinação com resveratrol. Contudo, ao reduzir a concentração de kefir para 10% em combinação com o resveratrol, 66,6% das amostras sofreram forte inibição, e 33,3% mostraram inibição moderada.

**Figura 5** - Comportamento de cepas de *Staphylococcus epidermidis* cultivadas *in vitro* com diferentes concentrações de kefir e/ou resveratrol. As barras retratam o grau de inibição bacteriana, classificadas de ausente até forte. O eixo horizontal descreve as substâncias e suas respectivas concentrações, evidenciando a eficiência correspondente.



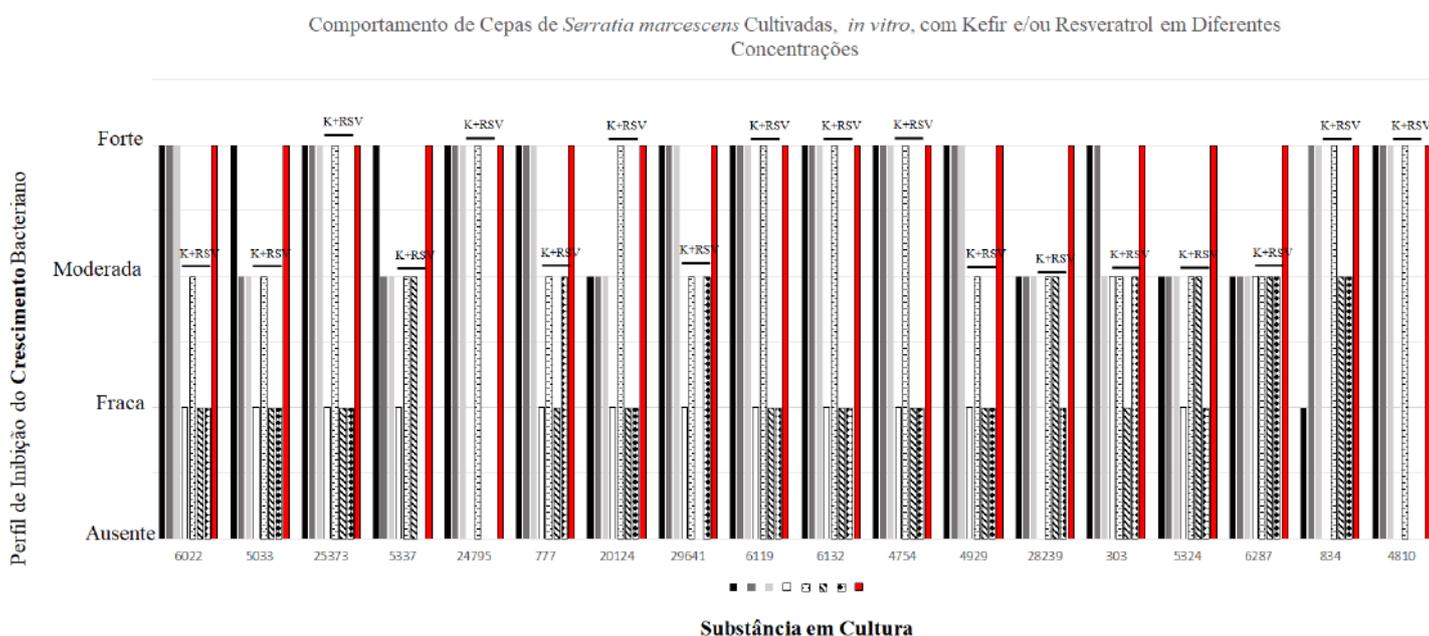
Fonte: Autores (2023).

Na Figura 5, cada série de colunas representa uma cepa única de *Staphylococcus epidermidis*, cada uma marcada por um código numérico. Os tratamentos aplicados são diferenciados visualmente no gráfico por meio de padrões de preenchimento: estes variam desde o kefir em concentrações de 40%, 20% e 10%, passando pelo resveratrol isoladamente, até a sua associação com o kefir em diferentes proporções, e um controle com antibiótico. A altura de cada coluna é proporcional ao grau de inibição causado aos microrganismos, com colunas mais altas indicando uma inibição mais proeminente e colunas mais baixas, ou a sua inexistência, denotando uma inibição menos expressiva.

### *Serratia marcescens*

Para *Serratia marcescens* (Figura 6) cultivadas com kefir 40%, 72,2% das cepas apresentaram forte inibição, 22,2% moderada e 5,5% fraca. Com kefir 20%, 66,7% mostraram forte inibição e 33,3% inibição moderada. No cultivo com kefir a 10%, 61% das cepas foram fortemente e 39% moderadamente inibidas. Utilizando apenas resveratrol, 22% das cepas não foram inibidas, 67% indicaram pouca inibição e 11% inibição moderada. Na combinação resveratrol + kefir a 40%, 44% das cepas mostraram forte inibição e 56% moderada. Notavelmente, as combinações resveratrol + kefir a 20% e a 10% apresentaram resultados semelhantes: em ambas, 55,5% das cepas indicaram pouca inibição, 27,8% inibição moderada e 16,7% com ausência de inibição.

**Figura 6** - Comportamento de cepas de *Serratia marcescens* cultivadas *in vitro* com diferentes concentrações de kefir e/ou resveratrol. As barras verticais representam níveis variáveis de inibição bacteriana, de ausente a forte, enquanto as substâncias testadas estão detalhadas no eixo horizontal, mostrando a eficácia relativa de cada combinação.



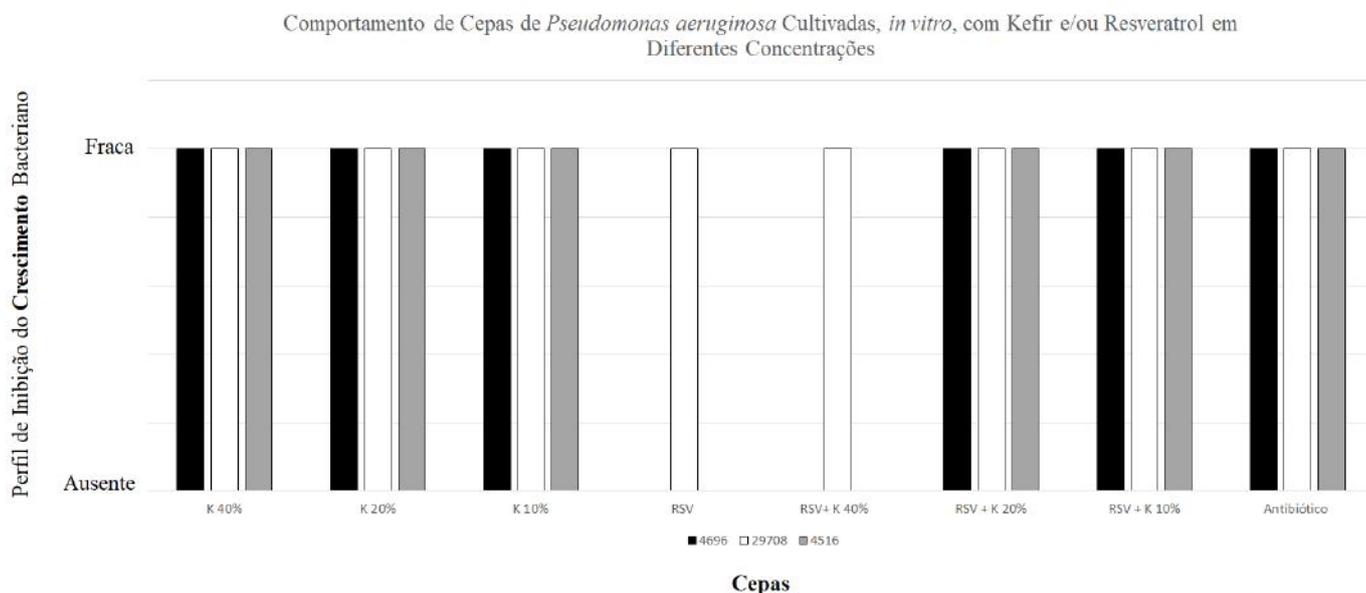
Fonte: Autores (2023).

No gráfico da Figura 6, é possível observar que cada grupo de colunas está associado a uma cepa específica de *Serratia marcescens*, identificável por um número atribuído. As texturas variadas nas colunas sinalizam os diferentes substratos testados: concentrações de kefir de 40%, 20% e 10%, resveratrol por si só ou em mistura com o kefir, e um controle de antibiótico. A altura das colunas é inversamente proporcional à atividade bacteriana, com alturas maiores indicando uma maior inibição e alturas menores apontando para uma menor ação inibitória. Este arranjo facilita a análise comparativa do impacto de cada substrato sobre as cepas em estudo.

### *Pseudomonas spp.*

Ao observarmos o comportamento de cepas de *Pseudomonas spp.* (Figura 7) com kefir a 40%, 20% e 10%, consideramos que 100% das cepas tiveram pouca inibição nessas diluições. Já ao analisarmos o resultado do resveratrol isoladamente, a maioria não inibiu, representando 66,66% e apenas 33,33% houve pouca inibição, obtendo o mesmo resultado na associação de resveratrol e kefir 40%. Por sua vez, no simbiótico resveratrol + kefir a 20%, resveratrol + kefir 10% e antibiótico ocorreram pouca inibição na totalidade (100%) das cepas.

**Figura 7** - Comportamento de cepas de *Pseudomonas* spp. cultivadas *in vitro* com diferentes concentrações de kefir e/ou resveratrol. As barras ilustram o nível de inibição do crescimento bacteriano, variando de ausente a forte, e as substâncias em cultura são detalhadas na parte inferior, demonstrando a eficácia relativa de cada inibição.



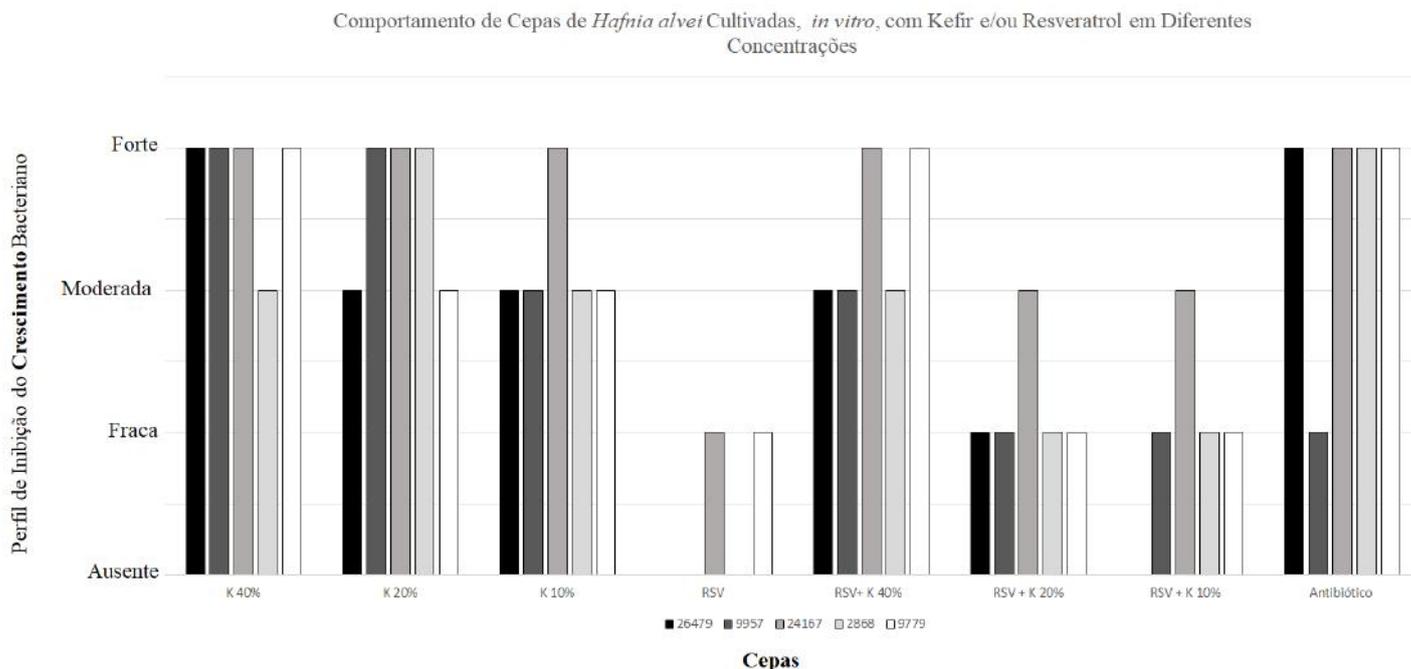
Fonte: Autores (2023).

Na representação gráfica da Figura 7, cada agrupamento vertical de barras corresponde a uma cepa distinta de *Pseudomonas* spp., que é distinguida por uma numeração única. As diferentes texturas nas barras representam variados tratamentos, incluindo kefir em três concentrações distintas (40%, 20% e 10%), resveratrol sozinho, ou a combinação de resveratrol com kefir, além de um padrão de antibiótico para referência. A escala vertical das barras é um indicativo direto do nível de inibição que cada tratamento impõe ao crescimento bacteriano: barras mais elevadas apontam para uma inibição mais significativa, enquanto barras mais curtas ou sua ausência sugerem uma eficácia menor.

### *Hafnia alvei*

Para as cepas de *Hafnia alvei* (Figura 8), o kefir a 40% provocou forte inibição em 80% e moderada em 20%. Com 20% de kefir, 60% das cepas foram fortemente inibidas e 40% moderadamente. No kefir a 10%, a inibição foi majoritariamente moderada (80%), com 20% de forte inibição. O resveratrol isolado resultou em 60% de cepas não inibidas e 40% levemente inibidas. Quando combinado ao kefir 40%, 60% das cepas apresentaram inibição moderada e 40% forte. Já na combinação com kefir 20%, 80% das cepas foram levemente inibidas e 20% moderadamente. Na combinação resveratrol + kefir 10%, tivemos 60% de leve inibição, 20% moderada e 20% sem inibição.

**Figura 8** - Comportamento de cepas de *Hafnia alvei* cultivadas *in vitro* com diferentes concentrações de kefir e/ou resveratrol. As barras ilustram o nível de inibição do crescimento bacteriano, variando de ausente a forte, e as substâncias em cultura são detalhadas na parte inferior, demonstrando a eficácia relativa de cada inibição.



Fonte: Autores (2023).

Na Figura 4, cada série de colunas representa uma cepa única de *Hafnia alvei*, cada uma marcada por um código numérico. Os tratamentos aplicados são diferenciados visualmente no gráfico por meio de padrões de preenchimento: estes variam desde o kefir em concentrações de 40%, 20% e 10%, passando pelo resveratrol isoladamente, até a sua associação com o kefir em diferentes proporções, e um controle com antibiótico. A altura de cada coluna é proporcional ao grau de inibição causado aos microrganismos, com colunas mais altas indicando uma inibição mais proeminente e colunas mais baixas, ou a sua inexistência, denotando uma inibição menos expressiva.

#### 4. Discussão

Dada a complexidade das interações e a diversidade de resultados observados neste estudo, é essencial uma investigação mais aprofundada das interações entre o kefir e o resveratrol. No contexto em que a resistência bacteriana aos antibióticos são preocupações válidas, estudos clínicos para avaliar a eficácia prática *in vivo* destes agentes são cruciais, não apenas para determinar sua segurança e eficácia, mas também para entender precisamente os mecanismos de ação envolvidos em todos os cenários microbiológicos apresentados.

Embora o kefir e o resveratrol tenham propriedades antimicrobianas reconhecidas, seus efeitos combinados não necessariamente se traduzem em maior eficácia. Pode haver interações entre os componentes bioativos do kefir e o resveratrol que afetam suas capacidades combinadas em inibir o crescimento bacteriano. Além disso, é importante considerar que diferentes cepas podem ter diferentes níveis de resistência ou susceptibilidade a estes agentes, o que pode influenciar os resultados observados.

Os componentes bioativos no kefir, como ácidos orgânicos, peptídeos e polissacarídeos, parecem desempenhar um papel vital na inibição bacteriana. O kefir também pode atuar competindo por nutrientes e locais de adesão, bem como desestabilizando biofilmes. Existe uma clara relação dose-resposta entre a concentração de kefir e sua eficácia (Azizi et al.,

2021). A combinação de kefir e resveratrol também apresentou uma dinâmica interessante de concentração, mostrando sinergia em alguns cenários e antagonismo em outros.

O kefir mostrou uma eficácia antimicrobiana contra as cepas de *Proteus spp.* que varia conforme sua concentração. Curiosamente, enquanto esperaríamos uma maior inibição com o aumento da concentração, o kefir a 20% superou o kefir a 40% na inibição forte das cepas. Isso sugere que a presença de componentes bioativos no kefir, como ácidos orgânicos, peptídeos e polissacarídeos, pode desempenhar um papel significativo na inibição do crescimento bacteriano, mas que a eficácia pode se estabilizar ou até mesmo diminuir em concentrações muito altas.

Quando cultivado isoladamente, o resveratrol demonstrou uma inibição menos pronunciada em comparação com o kefir. A inibição fraca foi predominante, sugerindo que, embora o resveratrol possua propriedades antimicrobianas, ele pode não ser tão eficaz contra *Proteus spp.* como o kefir. A combinação de resveratrol com kefir a 40%, não pareceu aumentar significativamente a forte inibição quando comparada ao kefir isolado. De fato, houve uma distribuição quase igual entre forte, moderada e fraca inibição, sugerindo que a presença de resveratrol pode ter alterado a eficácia do kefir nessa concentração. Nas concentrações de 20% e 10%, os resultados foram consistentes, com a maioria das cepas sendo fracamente inibidas pelo simbiótico.

Em relação ao *Streptococcus pyogenes*, pode-se observar uma clara dependência da concentração do kefir quanto à sua eficácia inibitória. Na concentração de 40%, o kefir mostrou a maior proporção de cepas fortemente inibidas quando comparada à inibição obtida na concentração de 20%. Em uma concentração ainda menor, 10%, o kefir parece perder sua capacidade de inibição forte, mas se mantém eficaz em gerar uma resposta inibitória moderada na maioria das amostras.

O resveratrol, por si só, exibiu uma eficácia inibitória mais moderada contra *Streptococcus pyogenes*. A ausência de qualquer inibição forte e o equilíbrio entre inibição moderada e fraca, além de uma proporção significativa de cepas não afetadas, sugerem que o resveratrol pode não ser tão eficaz contra esta bactéria específica.

O simbiótico a 40% pareceu potencializar o efeito inibitório do kefir, como evidenciado pelo aumento na proporção de cepas fortemente inibidas. No entanto, essa potencialização não foi observada nas concentrações mais baixas de kefir. Na verdade, a combinação com 20% e 10% de kefir resultou em uma inibição predominantemente fraca, sugerindo que o resveratrol pode atenuar a eficácia do kefir nesses níveis.

O kefir exibiu um forte poder inibitório contra *Staphylococcus aureus* em todas as concentrações testadas, inibindo 100% das cepas. Este padrão sugere um mecanismo de ação altamente eficaz do kefir contra *Staphylococcus aureus* que pode ser atribuído à produção de ácidos orgânicos pelo kefir, gerando um ambiente inóspito, e na liberação de bacteriocinas que neutralizam diretamente a bactéria. Além disso, os constituintes do kefir competem ativamente por nutrientes e locais de fixação, limitando a oportunidade para *Staphylococcus aureus* se estabelecer e proliferar (Erdogan et al., 2019)

O resveratrol mostrou-se menos competente na inibição de *Staphylococcus aureus*, com inibições fracas em proporções três vezes maiores que a porção com inibição moderada. Nenhuma forte inibição foi registrada, sugerindo que o resveratrol não é tão eficaz quanto o kefir contra a espécie bacteriana.

A sinergia potencial entre kefir e resveratrol não se materializou como esperado. Ao invés de melhorar, a combinação na verdade reduziu a eficácia inibitória do kefir em todas as concentrações testadas. Especificamente, nas concentrações de kefir a 40% e a 20%, a inibição forte caiu para metade das cepas. A combinação de kefir a 10% e resveratrol apresentou uma inibição forte em um pouco menos que dois terços das cepas, contrastando acentuadamente com a eficácia de 100% do kefir isolado.

Assim como para as cepas de *Staphylococcus aureus*, o kefir, independentemente da concentração, se mostrou eficaz em inibir 100% das cepas de *Staphylococcus epidermidis*. Essa eficácia chama atenção para o potencial do kefir como agente antimicrobiano contra patógenos do gênero *Staphylococcus*, sugerindo seu uso promissor em abordagens terapêuticas ou

profiláticas. As similaridades em suas estruturas celulares e mecanismos metabólicos podem ser a chave para entender a eficácia do kefir contra ambas espécies. O kefir age através da produção de ácido láctico e ácido acético, e da secreção de bacteriocinas que atacam diretamente a parede celular gram-positiva, podendo penetrar e desestabilizar biofilmes, tornando as bactérias mais susceptíveis à inibição (Erginkaya et al., 2018).

O resveratrol isolado também demonstrou eficácia contra *Staphylococcus epidermidis*, embora com uma variedade de respostas. Isto sugere que, embora o resveratrol possa não ser tão universalmente eficaz quanto o kefir, ele ainda tem valor como um agente antimicrobiano contra certas cepas da bactéria.

Ao combinar o kefir e o resveratrol, notou-se um aumento na proporção de cepas que sofrem forte inibição, especialmente nas concentrações mais elevadas de kefir (40% e 20%). Esta sinergia positiva sugere que a combinação dos dois agentes pode aprimorar suas respectivas ações antimicrobianas, resultando em uma inibição mais evidente. A diminuição da eficácia inibitória da combinação, quando a concentração de kefir foi reduzida para 10%, destaca uma possível relação dose-resposta entre o kefir e o resveratrol. Isso propõe que o impacto sinérgico do resveratrol pode ser mais efetivo quando presente em combinação com maiores concentrações de kefir.

Vale ressaltar a importância clínica de *Staphylococcus epidermidis*, frequentemente associada a infecções hospitalares, especialmente em dispositivos médicos implantáveis (Michelin et al., 2019). Portanto, encontrar agentes naturais eficazes contra essa bactéria é crucial na prática médica.

A avaliação do potencial inibitório do kefir e do resveratrol, seja isoladamente ou em combinação, sobre *Serratia marcescens*, revelou nuances interessantes sobre a interação desses agentes com a bactéria. O cultivo com concentrações decrescentes de kefir ainda apresentava eficácia substancial, com mais da metade das cepas sendo fortemente inibidas mesmo na menor concentração de 10%.

Quando aplicado isoladamente, o resveratrol mostrou ser menos efetivo contra *Serratia marcescens*, com a maioria das cepas exibindo apenas fraca inibição e a porção restante não mostrando inibição alguma. Estes resultados reforçam a noção de que o resveratrol pode não ser a primeira escolha como agente inibitório alternativo para esta bactéria.

Ao contrário do observado para *Staphylococcus aureus*, a combinação de resveratrol com kefir para *Serratia marcescens* não reduziu drasticamente a eficácia inibitória do kefir, mas houve uma mudança. Na concentração de 40% de kefir, a combinação ainda manteve uma inibição substancial. Entretanto, nas concentrações de 20% e 10% de kefir, a presença de resveratrol parece atenuar a eficácia do kefir, aumentando a porcentagem de cepas com inibição fraca e, inclusive, introduzindo uma proporção de cepas que não foram inibidas.

Independentemente da concentração de kefir (40%, 20% ou 10%), as cepas de *Pseudomonas spp.* exibiram apenas uma inibição fraca. Isto é surpreendente, considerando a eficácia do kefir observada contra outras bactérias avaliadas. Estes resultados podem indicar que as cepas de *Pseudomonas spp.* possuem mecanismos de resistência ou de adaptação específicos que as tornam menos suscetíveis ao efeito antimicrobiano do kefir.

O resveratrol isoladamente não exerceu um efeito inibitório significativo sobre a *Pseudomonas spp.* Com dois terços das cepas não mostrando inibição e apenas um terço exibindo inibição fraca, fica claro, também, que o resveratrol sozinho pode não ser uma opção viável contra esta bactéria.

A adição do resveratrol ao kefir em uma concentração de 40% não aumentou a inibição da bactéria. O mesmo perfil de inibição observado com o resveratrol isolado foi mantido. Nas diluições de 20% e 10%, a associação também resultou apenas em inibição fraca. Isso sugere que a combinação não tem um efeito sinérgico sobre *Pseudomonas spp.* como observado para outros microrganismos, reforçando o reconhecido desafio associado à resistência antimicrobiana das cepas de *Pseudomonas spp.*, tornando a busca por alternativas antimicrobianas para este patógeno ainda mais crítica.

O kefir mostrou ser eficaz na inibição de *Hafnia alvei*, especialmente nas concentrações mais elevadas. A forte inibição observada em 80% das cepas com kefir a 40% e em 60% das cepas com kefir a 20% indica que os componentes bioativos presentes no kefir são substancialmente eficazes contra esta bactéria. Notavelmente, à medida que a concentração de kefir diminui, a inibição passa a ser predominantemente moderada, sugerindo uma relação dose-resposta.

O resveratrol, por si só, mostrou-se menos eficaz contra a espécie, com a maioria das cepas não apresentando inibição. Quando associado com o kefir (40%), a combinação resultou em inibição moderada ou forte, similar ao padrão observado com kefir sozinho, indicando que o resveratrol pode não adicionar benefícios significativos nessa concentração. No entanto, nas concentrações de kefir mais baixas (20% e 10%), o resveratrol parece atenuar o efeito inibitório do kefir. Em particular, com kefir a 20%, a combinação resultou em uma inibição predominantemente leve, enquanto o kefir sozinho havia mostrado forte e moderada inibição. As diferenças nas respostas inibitórias podem ser atribuídas às diversas interações químicas e biológicas entre os componentes do kefir, do resveratrol e da própria bactéria. Possivelmente, a presença do resveratrol pode alterar de alguma forma o ambiente ou a ação dos componentes antimicrobianos do kefir.

Por fim, neste estudo o potencial do kefir destacou-se particularmente contra cepas do gênero *Staphylococcus*. Além desta, propriedades inibitórias também foram evidentes para *Streptococcus pyogenes*, *Serratia marcescens* e *Hafnia alvei*. No entanto, sua combinação com resveratrol demonstrou resultados variáveis, com sinergias positivas em alguns casos, enquanto em outros, a adição de resveratrol atenuou os efeitos inibitórios do kefir.

Por outro lado, o resveratrol não se mostrou tão potente quanto o kefir contra muitos dos patógenos testados. A combinação de ambos, em certas situações, não apresentou a sinergia positiva esperada. Especificamente em relação a *Pseudomonas spp.*, tanto o kefir quanto o resveratrol tiveram eficácia limitada. Isso reforça a necessidade de aprofundar estudos envolvendo estas e outras cepas, buscando novas alternativas de inibição às quais elas sejam sensíveis.

Em última análise, enquanto o kefir e o resveratrol mostram potencial em contextos específicos, uma abordagem cautelosa e baseada em evidências é necessária antes de considerá-los como alternativas viáveis ou complementares aos antibióticos convencionais.

Ao avaliar a aplicabilidade clínica do kefir e do resveratrol, seja isoladamente ou em combinação, é imperativo considerar as concentrações, as cepas bacterianas específicas e os mecanismos de interação entre os agentes. Cada patógeno apresentou uma resposta única, propondo a necessidade de abordagens individualizadas e uma pesquisa contínua para otimizar o uso destes agentes na prática clínica.

## 5. Considerações Finais

O kefir, isolado ou em combinação com o resveratrol, revelou propriedades antimicrobianas competentes. A eficácia na inibição do crescimento bacteriano está intrinsecamente ligada à concentração do extrato empregado, à sua interação com o resveratrol e à particularidade da cepa bacteriana em estudo. Reforçamos a necessidade de abordar a aplicação clínica do kefir e do resveratrol com profundidade. A generalização de sua eficácia é inviável devido à singularidade da resposta de cada patógeno. Antes de serem aceitos como alternativas ou complementos confiáveis aos antibióticos tradicionais, é vital a busca contínua por evidências sólidas.

Para trabalhos futuros, recomendamos uma exploração mais aprofundada da sinergia entre o kefir e o resveratrol no combate a diferentes patógenos, com ênfase na variação das concentrações e na interação específica com cada tipo de cepa bacteriana. Estudos adicionais devem ser direcionados para entender as vias moleculares envolvidas na ação antimicrobiana destes agentes, bem como a eficácia em modelos *in vivo*. Além disso, a pesquisa deve estender-se para avaliar a segurança e a viabilidade da utilização clínica destes compostos, seja como monoterapias ou em combinação, em comparação com os

tratamentos antibióticos convencionais. Isso é crucial para estabelecer o kefir e o resveratrol como alternativas terapêuticas legítimas no cenário de crescente resistência antimicrobiana.

Finalmente, este estudo contribuiu para futuras investigações. Reitera-se a necessidade de uma abordagem metódica, individualizada e dinâmica no desenvolvimento de estratégias terapêuticas envolvendo kefir, resveratrol ou qualquer outro agente promissor no combate a patógenos resistentes.

## Referências

- Abedini, E., Khodadadi, E., Zeinalzadeh, E., Moaddab, S. R., Asgharzadeh, M., Mehramouz, B., Dao, S., & Samadi Kafil, H. (2021). A Comprehensive Study on the Antimicrobial Properties of Resveratrol as an Alternative Therapy. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2021, 8866311. <https://doi.org/10.1155/2021/8866311>
- Azizi, N. F., Kumar, M. R., Yeap, S. K., Abdullah, J. O., Khalid, M., Omar, A. R., Osman, M. A., Mortadza, S. A. S., & Alitheen, N. B. (2021). Kefir and Its Biological Activities. *Foods* (Basel, Switzerland), 10(6), 1210. <https://doi.org/10.3390/foods10061210>
- Barros, L. M., Bento, J. N. C., Caetano, J. A., Moreira, R. A. N., Pereira, F. G. F., Frota, N. M., Araujo, T. M. de, & Soares, E. (2012). Prevalência de microorganismos e a sensibilidade antimicrobiana de infecções hospitalares em uma unidade de terapia intensiva de um hospital público. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 33, 429-435. <https://rcfba.fcfar.unesp.br/index.php/ojs/article/view/281/279>
- Bengoa, A. A., Iraporda, C., Garrote, G. L., & Abraham, A. G. (2019). Kefir micro-organisms: their role in grain assembly and health properties of fermented milk. *Journal of applied microbiology*, 126(3), 686–700. <https://doi.org/10.1111/jam.14107>
- Berman, A.Y., Motechin, R.A., Wiesenfeld, M.Y., & et al. (2017). The therapeutic potential of resveratrol: a review of clinical trials. *npj Precision Onc*, 1, 35. <https://doi.org/10.1038/s41698-017-0038-6>
- Carreon FT, Mora KA, Barrera ICR, Andrade A. (2022) *Serratia marcescens* antibiotic resistance mechanisms of an opportunistic pathogen: a literature review. *PeerJ*. <http://doi.org/10.7717/peerj.14399>
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2023). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing* (33rd ed.). CLSI supplement M100.
- Erdogan, F. S., Ozarslan, S., Seydim, Z. B. G., & Tas, T. K. (2019). The effect of kefir produced from natural kefir grains on the intestinal microbial populations and antioxidant capacities of Balb/c mice. *Food Research International*, 115, 408-413. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.080>
- Erginkaya, Z., Turhan, E. U., & Tatl, D. (2018). Determination of antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from traditional Turkish fermented dairy products. *Iranian journal of veterinary research*, 19(1), 53–56.
- Estrela, C. (2018). Metodologia Científica: Ciência, Ensino, Pesquisa. *Editora Artes Médicas*.
- Marques, V. D., Franzolin, M. R., Sanabani, S. S., Vigerelli, H., Piazza, R. M. F., Pimenta, D. C., Venâncio, T., Neves, I. V., de Sousa Silva, H. G., Dos Santos Courrol, D., Mendonça-Previato, L., Previato, J. O., Jorge, S. A. C., & de Oliveira Domingos, M. (2020). A new class of antimicrobial molecules derived from kefir, effective against *Pseudomonas aeruginosa* and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. *Scientific reports*, 10(1), 17434. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73651-7>
- Michelin, A.F., & Fonseca, M.R. (2018). Perfil epidemiológico das infecções hospitalares na unidade de terapia intensiva de um hospital terciário.
- Monika, Sharma, S., & Kumar, N. (2020). Use of plant derived antimicrobials as an alternative to antibiotics. *J Pharmacogn Phytochem*, 9(2), 1524-1532. <https://doi.org/10.22271/phyto.2020.v9.i2y.11069>
- Novelle, M. G., Wahl, D., Diéguez, C., Bernier, M., & de Cabo, R. (2015). Resveratrol supplementation: Where are we now and where should we go? *Ageing Research Reviews*, 21, 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2015.01.002>
- Rosa, D. D., Dias, M. M. S., Grześkowiak, Ł. M., Reis, S. A., Conceição, L. L., & Peluzio, M. D. C. G. (2017). Milk kefir: nutritional, microbiological and health benefits. *Nutrition research reviews*, 30(1), 82–96. <https://doi.org/10.1017/S0954422416000275>
- Salehi, B., Mishra, A. P., Nigam, M., Sener, B., Kilic, M., Sharifi-Rad, M., Fokou, P. V. T., Martins, N., & Sharifi-Rad, J. (2018). Resveratrol: A Double-Edged Sword in Health Benefits. *Biomedicines*, 6(3), 91. <https://doi.org/10.3390/biomedicines6030091>
- Santos, N. de Q. (2004). A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. *Texto & Contexto Enfermagem*, 13, 64–70. <https://doi.org/10.1590/S0104-07072004000500007>
- Singh, A. P., Singh, R., Verma, S. S., Rai, V., Kaschula, C. H., Maiti, P., & Gupta, S. C. (2019). Health benefits of resveratrol: Evidence from clinical studies. *Medicinal Research Reviews*, 39(5), 1851-1891. <https://doi.org/10.1002/med.21565>
- Turrini, R. N. T. (2002). Infecção hospitalar e mortalidade / Nosocomial infection and mortality. *Revista da Escola de Enfermagem da USP*, 36(2), 177-183. <https://doi.org/10.1590/S0080-62342002000200011>
- Vestergaard, M., & Ingmer, H. (2019). Antibacterial and antifungal properties of resveratrol. *International journal of antimicrobial agents*, 53(6), 716–723. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.02.015>
- World Health Organization. Regional Office for Europe. (2022). WHO Country Office in Ukraine, 2020–2021 report. *World Health Organization. Regional Office for Europe*. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/363750>
- Zanirati, D. F., Abatamarco, M., Jr, Sandes, S. H. C., Nicoli, J. R., Nunes, Á. C., & Neumann, E. (2015). Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures. *Anaerobe*, 32, 70–76. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.12.007>