

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL – UFMS
Campus de **CAMPO GRANDE – FACULDADE DE MEDICINA**
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E DESENVOLVIMENTO DA
REGIÃO CENTRO OESTE

ANTOLIM PENHA MARTINEZ JUNIOR

INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE UMA FRAÇÃO DE UM
KEFIR

Campo Grande – MS

Fevereiro – 2024

ANTOLIM PENHA MARTINEZ JUNIOR

**INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE UMA FRAÇÃO DE UM
KEFIR**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro Oeste, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste. Linha de Pesquisa: Metabolismo e Nutrição.

Orientadora: Dra. Maria Lígia Rodrigues Macedo

Coorientadora: Dra. Elisângela Serenato Madalozzo

Campo Grande – MS

Fevereiro – 2024

ANTOLIM PENHA MARTINEZ JUNIOR

**INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE UMA FRAÇÃO DE UM
KEFIR**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro Oeste, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste. Linha de Pesquisa: Metabolismo e Nutrição.

Orientadora: Dra. Maria Lígia Rodrigues Macedo

Coorientadora: Dra. Elisângela Serenato Madalozzo

Banca examinadora:

Nota/Conceito

Maria Lígia Rodrigues Macedo – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição (UFMS)

Thalita Bachelli Riul – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição (UFMS)

Teofilo Fernando Mazon Cardoso – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição (UFMS)

Priscila Aiko Hiane – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição (UFMS) (Suplente)

AVALIAÇÃO FINAL: () Aprovado () Reprovado

Agradecimentos

Creio que seja impossível agradecer o suficiente as pessoas mais importantes da minha vida, minha mãe, Luzia e ao meu falecido pai, Antolim. Foi uma caminhada muito difícil ao longo dos anos... eu realmente sei que foi. Porém, os esforços e esperanças de vocês com certeza não foram em vão. Também, a minha companheira Nathália. Ela sempre me agraciou com a sua companhia, apoio, amor e carinho, não medindo esforços para me ajudar durante esta jornada.

A minha querida orientadora, professora Maria Lígia, por ter me dado uma oportunidade em seu laboratório (LPPFB). Ela não mediu esforços para me dar confiança e garantir que o meu aprendizado e a minha pesquisa fossem possíveis. Além disso, gostaria de expressar minha gratidão também pelo apoio e incentivo que a senhora sempre demonstrou em relação ao meu desenvolvimento pessoal. Suas palavras de encorajamento e o seu exemplo profissional deixaram uma marca positiva em mim. Afirmando e acredito que a sua excelência não fica somente no campo da ciência. Que esta nota possa transmitir, mesmo que de maneira modesta, a gratidão que sinto. Obrigado por ter me mostrado uma nova face da ciência.

A professora Ana Cristina, Claudiane, Patrícia e Tamaeh, por terem também sido mentoras, me cobrado bastante, ajudado bastante, cobrado bastante, ensinado bastante e por fim, por serem pessoas ótimas e gentis que me apoiaram e me ensinaram muito durante a caminhada. A orientação de vocês auxiliou o meu crescimento e por isso, sou muitíssimo grato.

Ao meu amigo Lucas que me apoiou a seguir nessa jornada desde o primeiro momento em que fui aprovado no vestibular. Embora o seu time de coração seja...questionável, o seu companheirismo e ajuda eu nunca esquecerei.

Aos técnicos e companheiros da equipe do Laboratório de Purificação de Proteínas e suas Funções Biológicas (LPPFB). Professores, pesquisadores, alunos e colaboradores que auxiliaram no desenvolvimento direta ou indiretamente desse incrível trabalho.

Aos professores Thalita, Teófilo e Priscila por terem gentilmente aceitado fazer parte da banca de avaliação da minha dissertação de Mestrado. A presença de vocês em minha banca enriquece ainda mais este trabalho com perspectivas valiosas.

Por ter participado do PPGSD e da UFMS. É um orgulho carregar os seus brasões. Ao órgão fomentador CNPq pelo auxílio financeiro e pela disponibilização da bolsa de pesquisa. Aos órgãos fomentadores CAPES, FUNDECT E FINEP por terem contribuído também com recursos para a realização dessa pesquisa.

RESUMO

Introdução - O kefir é uma bebida fermentada de baixo custo que é produzida por grãos compostos por uma associação simbiótica de bactérias e leveduras. Outros trabalhos já demonstraram que compostos isolados da bebida possuem atividade biológica comprovada. Com a crescente ameaça da resistência antimicrobiana, o kefir emerge como uma opção barata e sustentável para a exploração de novas biomoléculas com potencial antimicrobiano. **Objetivo** - avaliar a atividade antimicrobiana de uma fração da bebida fermentada de um kefir de leite e traçar seu perfil proteico. **Métodos** - A bebida fermentada foi centrifugada em 4 etapas, sendo a primeira a 18000 RPM e as 3 subsequentes foram realizadas com filtros de concentração proteica com base no peso molecular (30, 10 e 3 kDa) a 7500 RPM. O sobrenadante do kefir resultante da primeira etapa de centrifugação, foi submetido ao processo de eletroforese em gel de acrilamida, e as bandas proteicas identificadas tiveram a sua região N-terminal sequenciada. A atividade antimicrobiana do concentrado proteico resultante do processo de centrifugação utilizando filtros de corte com base no peso molecular (<3 kDa) foi avaliada frente às cepas bacterianas gram positivas e negativas por meio de ensaios de concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM). O mecanismo de ação do concentrado proteico <3 kDa foi avaliado com o auxílio do marcador fluorescente *Sytox Green*. Esta fração foi avaliada também por cromatografia líquida de alta eficiência e por espectrometria de massas. **Resultados** - Da primeira fração isolada do kefir, foi obtido a sequência N-terminal de 2 bandas proteicas purificadas pela eletroforese em gel, com 14 e 22 resíduos respectivamente que não apresentaram similaridade a outras já publicadas. O concentrado proteico <3 kDa demonstrou amplo espectro de ação frente as espécies bacterianas avaliadas, com valores de CIM e CBM entre 25 a 100 mg/mL. Adicionalmente, foi constatado através do aumento da fluorescência de *Sytox Green* que o mecanismo de ação deste concentrado ocorre por danos à membrana bacteriana. Este efeito pode estar associado à presença dos peptídeos identificados pela espectrometria de massas. **Conclusão** - Em conjunto, os resultados apontam a eficácia antibacteriana do concentrado proteico avaliado, e reforçam o potencial do kefir como terapia antimicrobiana alternativa e fonte de biomoléculas com potencial biotecnológico.

Descritores: kefir; antimicrobiano; peptídeos; bebida fermentada, proteínas

ABSTRACT

Introduction - Kefir is a low-cost fermented beverage produced by grains composed of a symbiotic association of bacteria and yeasts. Studies have already demonstrated that isolated compounds from the beverage have already show that kefir fermented beverage has biological activity in various fields. With the growing threat of antimicrobial resistance, kefir emerges as a cheap and sustainable option for exploring new biomolecules with antimicrobial potential. **Objective** - evaluate the antimicrobial activity of a fraction of the fermented beverage from milk kefir and analyze the protein profile. The fermented beverage was centrifuged in 4 steps, the first one at 18000 RPM and the subsequent 3 centrifugations were carried out with protein concentration filters based on molecular weight (30, 10, and 3 kDa) at 7500 RPM. The supernatant of the kefir from the first centrifugation step, the fraction with the highest protein concentration, was subjected to acrylamide gel electrophoresis, and the identified protein bands had their N-terminal region sequenced. The antimicrobial activity of the protein concentrate resulting from the centrifugation process using molecular weight cut-off filters (<3 kDa) was evaluated against gram-positive and gram-negative bacterial strains through minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) assays. The mechanism of action of the <3 kDa protein concentrate was evaluated with the aid of the fluorescent marker *Sytox Green*. This fraction was also evaluated by ultra-high performance liquid chromatography and mass spectrometry. **Results** - From the first fraction isolated from kefir, the N-terminal sequence of 2 protein bands purified by gel electrophoresis was obtained, with 14 and 22 residues respectively, which showed no similarity to others already published. The <3kDa protein fraction demonstrated broad-spectrum activity against the evaluated bacterial species, with minimum inhibitory concentrations and minimum bactericidal concentrations ranging from 25 to 100 mg/mL. The mechanism of action through membrane damage of this fraction was confirmed by *Sytox Green*. Through accurate mass evaluation by mass spectrometry, the presence of peptide molecules was constated in this fraction, and it is possibly responsible for the observed microbial action. **Conclusion** - These results support the efficacy of kefir against microorganisms and reinforce its probiotic potential and a source of molecules with bioactive potential.

Descriptors: kefir; antimicrobial; antimicrobial peptides; fermented beverage.

Lista de códigos dos aminoácidos

AMINOÁCIDO	CÓDIGO
Alanina	A
Arginina	R
Asparagina	N
Aspartato	D
Cisteína	C
Fenilalanina	F
Glicina	G
Glutamato	E
Glutamina	Q
Histidina	H
Isoleucina	I
Leucina	L
Lisina	K
Metionina	M
Prolina	P
Serina	S
Treonina	T
Triptofano	W
Valina	V
Tirosina	Y

Lista de figuras

Figura 1. Benefícios promovidos pelo consumo de alimentos probióticos.....	18
Figura 2. Grãos de kefir.....	19
Figura 3. Representação do complexo ESKAPE. Estas espécies representam a maior preocupação na saúde pública global, podendo estar presentes em nossa microbiota natural, no ambiente, mas também representam risco patogênico.....	24
Figura 4. Cultivo do kefir e obtenção da bebida fermentada.....	29
Figura 5. Processo de centrifugação da bebida fermentada do kefir por meio dos filtros de ultracentrifugação Amicon®.....	30
Figura 6. Avaliação da absorção de Sytox™ Green por <i>S. aureus</i> MRSA 43300 em leitor de microplacas Varioskan LUX através da excitação (485 nm) e da emissão (520 nm) durante 260 min de incubação.....	40
Figura 7. Avaliação da absorção de Sytox™ Green por <i>S. aureus</i> ATCC 29213 em leitor de microplacas Varioskan LUX através da excitação (485 nm) e da emissão (520 nm) durante 260 min de incubação.....	40
Figura 8. Avaliação da absorção de Sytox™ Green por <i>S. aureus</i> MRSA 43300 em microscopia de fluorescência. O PK foi incubado frente a bactéria nas concentrações de 12,5, 25 e 50 mg/mL durante 24 h. As setas vermelhas indicam bactérias com a membrana comprometida e emitindo fluorescência ocasionada pela absorção de Sytox™ Green.....	42
Figura 9. Avaliação da absorção de Sytox™ Green por <i>S. aureus</i> ATCC 29213 em microscopia de fluorescência. O PK foi incubado frente a bactéria nas concentrações de 12,5, 25 e 50 mg/mL durante 24 h. As setas vermelhas indicam bactérias com a membrana comprometida e emitindo fluorescência ocasionada pela absorção de Sytox™ Green.....	43
Figura 10. Perfil cromatográfico em UHPLC do PK. As frações foram coletadas em um fluxo de 1 ml/min e a detecção decorreu a 220nm.....	44
Figura 11. Espectro de massas por MALDI-TOF dos picos de interesse de PK coletados por uHPLC. Os picos de massa acurada foram obtidos em modo refletido	

positivo com o uso de uma matriz constituída por ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA).....45

Figura 12. Gel de eletroforese SDS-PAGE 20% do sobrenadante do kefir (SK). As setas representam as bandas proteicas com massa aparente de 14 kDa (1) e a de 8 kDa (2).....46

Lista de tabelas

Tabela 1. Potencial terapêutico kefir.....	21
Tabela 2. Quantificação de proteínas solúveis do sobrenadante do kefir (SK) e do concentrado proteico do kefir (PK).....	38
Tabela 3. Atividade antibacteriana do PK.....	39
Tabela 4. Sequência de aminoácidos das bandas de massa aparente 8 e 14 kDa isoladas do SK.....	46

Lista de abreviaturas e siglas

ATCC – American Type Culture Collection
BHI – Brain Heart Infusion
BSA – Albumina sérica bovina
CBM – Concentração bactericida mínima
CIM – Concentração inibitória mínima
CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute
Da – Dalton
DO – Densidade óptica
H – Horas
kDa – Kilodaltons
KPC+ - Carbapenemase resistente
L – Litro
MHA – Mueller Hinton ágar
MH – Mueller hinton
mL- Mililitro
mM – milimolar
MRSA – Meticilina-resistente
min – Minutos
Mg – Miligrama
nm – Nanômetro
PK – Peptídeos do kefir
pH – Potencial hidrogeniônico
PVDF - Fluoreto de polivinilideno
RAM – Resistência Antimicrobiana
RPM – Rotações por minuto
SDS-PAGE – Dodecil sulfato de sódio - gel de eletroforese de poliacrilamida
SK – Sobrenadante do kefir
UA – Unidades de absorvância
UHPLC – Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
 μ L – Microlitro
 μ g - Micrograma

WHO – Organização Mundial da Saúde

% - Porcentagem

°C – Grau Celsius

Sumário

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Breve introdução do kefir	17
2.2 Resistência antimicrobiana	20
2.3 Peptídeos antimicrobianos	25
3 OBJETIVOS	27
3.1 Objetivo geral	27
3.2 Objetivos específicos	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 Cultivo do kefir	29
4.3 Filtragem da bebida fermentada	30
4.4 Quantificação de proteínas de SK e PK	31
4.5 Análise da atividade antibacteriana de SK e PK	31
4.5.1 Cultivo dos microrganismos	31
4.5.2 Teste de concentração inibitória mínima (CIM)	32
4.5.3 Teste de Concentração bactericida mínima (CBM)	32
4.6 Determinação do mecanismo de ação de PK	33
4.6.1 Análise quantitativa da permeabilidade de membrana por Sytox Green em leitor de microplacas	33
4.6.2 Análise qualitativa da permeabilidade de membrana por Sytox Green por microscopia de fluorescência	34
4.7 Cromatografia em coluna de fase reserva em uHPLC de PK	34
4.8 Determinação de massa específica por espectrometria de massas de PK	35
4.9 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) de SK	35
4.10 Eletrotransferência em difluoreto de polivinilideno	36
4.11 Determinação da sequência N-terminal	36
4.12 Análise das sequências de aminoácidos	37
5 RESULTADOS	38
5.1 Quantificação de proteínas solúveis	38
5.2 Avaliação da atividade antibacteriana	38
5.2.1 Potencial antimicrobiano de SK e PK	38
5.3 Investigação do mecanismo de ação do PK	39

5.3.1 Avaliação da permeabilidade da membrana bacteriana.....	39
5.3.2 Avaliação da permeabilidade de membrana por microscopia de fluorescência	41
5.4 Cromatografia líquida de alta performance em coluna C-18.....	44
5.5 Determinação de massa por espectrometria de massa do PK	44
5.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	45
5.7 Determinação da sequência N-Terminal.....	45
6 DISCUSSÃO	47
7 CONCLUSÃO.....	52
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

1 INTRODUÇÃO

A resistência antimicrobiana é uma preocupação de saúde pública em âmbito global. A cada ano, o número de cepas resistentes aos fármacos presentes no mercado aumenta e com isso, a mortalidade e a morbidade também. A escassez de novos fármacos emerge como uma preocupação para o combate a resistência antimicrobiana. As barreiras financeiras e de inovação impedem que o mercado desenvolva fármacos eficientes, o que cria uma lacuna entre a prospecção de alternativas terapêuticas e o surgimento de novas cepas resistentes, o que resulta em processos infecciosos cada vez mais complexos de serem tratados.

Os peptídeos antimicrobianos são biomoléculas naturalmente produzidas por seres vivos e desempenham inúmeras funções. No contexto atual, tem-se estudado cada vez mais este grupo de moléculas como possíveis alternativas terapêuticas contra diversas cepas resistentes. A diversidade estrutural e de função faz com que a capacidade destas moléculas sejam aprimoradas, o que reduz as chances do desenvolvimento de resistência antimicrobiana.

O kefir é uma bebida fermentada classificada pela Organização Mundial da Saúde como um probiótico e tem sido estudado e empregado em diversas áreas da medicina. Isto se dá devido às propriedades antimicrobianas, antifúngicas, anticâncer, antioxidante e imunomoduladoras comprovadas de biomoléculas pós-bióticas presentes nessa bebida. A necessidade pela inovação farmacológica de compostos eficientes, de baixo custo e que sejam sustentáveis, faz com que a busca por biomoléculas de fontes naturais com potencial biotecnológico, em especial o antimicrobiano, se tornem um atrativo para o mercado. Neste contexto, o kefir, uma bebida fermentada de baixo custo, emerge neste cenário como um ótimo candidato a exploração de biomoléculas para potencial aplicação terapêutica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Breve introdução do kefir

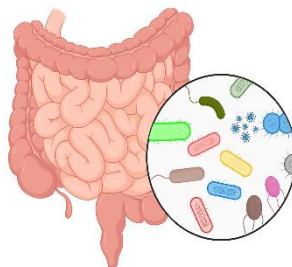
O termo “probiótico” foi utilizado pela primeira vez em 1907 pelo Nobel de Fisiologia ou Medicina russo Ilya Ilyich Mechnikov para designar substâncias desconhecidas de um protozoário ciliado que contribuía para o crescimento de outro. Em 1989, Fuller redefiniu este termo para “suplemento alimentar composto por microrganismos que beneficia a microbiota intestinal”. Atualmente, a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) considera que probióticos são “microrganismos vivos que quando consumidos em quantidades moderadas trazem benefícios ao hospedeiro” (FAO, 2016).

No cenário atual, as bactérias e leveduras probióticas podem ser encontradas em suplementos alimentares ou alimentos fermentados e são considerados uma alternativa alimentar segura, de custo baixo e benéfica para a saúde humana (Yadav *et al.*, 2022). O uso dos probióticos está historicamente associado principalmente a uma melhora na saúde gastrointestinal, onde contribuem principalmente para a proteção contra infecções, antagonizando patógenos virulentos e auxiliando no processo digestivo e na absorção de nutrientes (Piqué; Berlanga; Miñana-Galbis, 2019; Snigdha *et al.*, 2022).

Associa-se o consumo de probióticos também a melhora no sistema imune do hospedeiro, no sistema nervoso, redução do colesterol e há trabalhos que associam o uso destes alimentos com o tratamento e prevenção de doenças do trato gastrointestinal (Snigdha *et al.*, 2022; Yang *et al.*, 2020). O processo fermentativo realizado pelos probióticos também produzem compostos secundários, os pós-bióticos. Pós-bióticos são metabólitos produzidos pela ação das bactérias e leveduras probióticas como ácido lático, peróxido de hidrogênio, bacteriocinas e outros peptídeos que exibem atividade antimicrobiana de amplo espectro (**Figura 1**) (Silva *et al.*, 2020; Yadav *et al.*, 2022).

Figura 9 - Benefícios promovidos pelo consumo de alimentos probióticos.

Probióticos - Promoção a saúde



Nos últimos anos, um probiótico que tem ganhado destaque entre essa classe é o kefir. O kefir é uma bebida fermentada de caráter ácido-efervescente, viscosa e de baixo teor alcoólico. Sua origem precisa é incerta, porém, sabe-se que os grãos são originários das regiões frias e montanhosas do leste europeu, na região dos Balcãs e Cáucaso (Azizi *et al.*, 2021; Chong *et al.*, 2023; Silva *et al.*, 2020). Desde então, este alimento tem se difundido pelo mundo e chamado a atenção pela sua fácil maleabilidade, alto rendimento e baixo custo de produção (Silva *et al.*, 2020). O kefir é compartilhado pelas diferentes regiões do mundo por meio de um microbioma formado por uma complexa associação simbiótica de bactérias e leveduras que se organizam em “grãos” que realizam a fermentação da bebida. Os grãos (**Figura 2**) são irregulares, gelatinosos e com tamanho variando de 0,3 a 3 cm e os microrganismos estão dispersos sob eles em uma espessa rede de polissacarídeos por eles secretada, chamada de “kefiran” (Chong *et al.*, 2023). A comunidade microbiana do kefir é variada. Fatores como o local de origem dos grãos, clima, substrato utilizado para a fermentação, técnicas de manuseio e até mesmo a temperatura de armazenamento podem influenciar na composição do microbioma dos grãos (Chong *et al.*, 2023; Rosa *et al.*, 2017). A literatura aponta que mais de 300 espécies diferentes de microrganismos já foram descritas como presentes no microbioma de diferentes kefirs

ao redor do mundo. As espécies microbianas mais frequentes encontradas nos grãos de kefir pertencem aos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Candida*, *Saccharomyces* e *Kluyeveromyces* (Chong *et al.*, 2023; Rosa *et al.*, 2017).

Figura 10. Grãos de kefir



Foto: Acervo pessoal e Shutterstock

De forma geral, a bebida fermentada do kefir pode ser produzida utilizando diversos substratos orgânicos como base para a fermentação. Os grãos são imersos neste substrato e após um período fermentativo (24 a 72 h), em temperatura ambiente ou superior, pode-se obter a bebida fermentada (Rosa *et al.*, 2017). Alguns substratos menos comuns a base do suco de vegetais como maçã, kiwi, tomate, pera, melão, morango, uva, gengibre, cenoura, cebola e os melaços de cana e mel podem ser utilizados como base para o processo fermentativo dos grãos de kefir. Entretanto, os kefirs a base de leite (kefir de leite) e a base de água e açúcar (kefir de água) são as opções mais famosas e acessíveis da bebida (Azizi *et al.*, 2021). Dependendo do substrato utilizado na fermentação, a composição orgânica, sabor, textura e os pós-bióticos secretados pelo microbioma podem se alterar (Silva *et al.*, 2020). Além de carboidratos, proteínas e gorduras que formam a base da bebida, pode-se encontrar também ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, álcool, bacteriocinas, peptídeos, e ésteres além de vitaminas e minerais no kefir (Azizi *et al.*, 2021; Farag *et al.*, 2020; Rosa *et al.*, 2017).

A procura por alimentos naturais e funcionais é uma tendência do século XXI. Ela é impulsionada principalmente por uma maior preocupação com a saúde, bem-estar e a busca por alternativas saudáveis aos produtos industrializados. O kefir se encaixa perfeitamente nesse cenário, oferecendo uma opção nutritiva que contribui

para a saúde (Peluzio *et al.*, 2021). Graças a fácil obtenção e a variabilidade em sua composição, os componentes pós-bióticos do kefir tem sido alvo de pesquisas científicas com objetivo de se obter moléculas com aplicabilidades biotecnológicas (Tabela 1) (Bessa; Bessa; Bonamigo, 2023; Bilal *et al.*, 2022; De Oliveira Leite *et al.*, 2013; Peluzio *et al.*, 2021). Devido a este contexto, argumenta-se também que o kefir possa prevenir ou reduzir infecções causadas por microrganismos devido a riqueza de biomoléculas e outros componentes que compõe a bebida (Chong *et al.*, 2023).

2.2 Resistência antimicrobiana

Infecções microbianas são uma preocupação persistente da saúde da humanidade desde tempos antigos. A peste bubônica no século XIV e as frequentes epidemias de cólera nos séculos XIX e XX são exemplos históricos famosos de surtos que vitimaram e impactaram significativamente a vida de milhares de pessoas. Isso se deve, em parte, ao limitado conhecimento microbiológico da época e à falta de ferramentas para se combater as infecções que afetavam a população (Cook; Wright, 2022; Deen; Mengel; Clemens, 2020; Glatter; Finkelman, 2021). Porém, a partir do século XX, uma descoberta mudou o campo da medicina para sempre. A descoberta da penicilina em culturas fúngicas por Alexandre Fleming no final da década de 1920 e, sua incorporação como um medicamento de uso clínico no começo dos anos de 1940 foi um marco na história mundial (Tan; Tatsumura, 2015). Essa notável descoberta inaugurou a “era de ouro dos antibióticos” e a humanidade finalmente ganhou uma alternativa eficaz para combater infecções microbianas. Este contexto levou a melhora significativa da qualidade e da expectativa de vida da população no mundo (Cook; Wright, 2022; Ribeiro da Cunha; Fonseca; Calado, 2019; Salam *et al.*, 2023).

Ao longo das décadas seguintes, à medida que novos fármacos eram descobertos e introduzidos como agentes terapêuticos para o tratamento de infecções microbianas, uma preocupação começava a se intensificar: a resistência antimicrobiana (RAM) (Cook; Wright, 2022; Salam *et al.*, 2023; Uddin *et al.*, 2021). “RAM” refere-se à capacidade de microrganismos, como bactérias, vírus, fungos e

parasitas, resistirem aos tratamentos farmacológicos antimicrobianos (Salam *et al.*, 2023).

Tabela 1 – Potencial terapêutico kefir.

Kefir	Atividade biológica encontrada	Referência
Kefir de Leite: Fração concentrada da bebida fermentada (1 < kDa)	Atividade antimicrobiana <i>in-vitro</i> contra <i>S. aureus</i> metilicina-resistente (MRSA) e <i>P. aeruginosa</i>	Marques <i>et al.</i> , 2020
Microorganismo isolado de um kefir de água	Atividade antifúngica por meio do antagonismo de leveduras isoladas de um kefir de água contra espécies com potencial patogenicidade do gênero <i>Aspergillus</i>	Moure <i>et al.</i> , 2023
Kefir de leite: Sobrenadante da bebida fermentada	Atividade anticâncer <i>in-vitro</i> contra células cancerígenas cerebrais (Glioblastoma)	Fatahi <i>et al.</i> , 2019
Kefir de leite	Atividade antiviral do kefir contra o COVID-19 por meio do estímulo ao sistema imune (aumento da produção de células do sistema imunitário, anticorpos e citocinas)	Hamida <i>et al.</i> , 2021
Kefir de leite: Bebida fermentada	Atividade antioxidante e prevenção da formação de úlceras em ratos (<i>in-vivo</i>)	Cocô <i>et al.</i> , 2023
Microorganismo isolado de um kefir de leite	Imunomodulação: A bactéria <i>L. kefir</i> , isolada de um kefir induz a liberação IL-6 e IL-8 de tecidos <i>ex-vivo</i> e aumenta a frequência de CD4 + FOXP3 + LPTC nesses tecidos.	Curciarello <i>et al.</i> , 2021
Kefir de leite	Atividade antiinflamatória: Peptídeos isolados de um kefir de leite reduziram a artrite em joelhos de ratos pela inibição da IL-1 β , uma interleucina relacionada a inflamação	Chuang <i>et al.</i> , 2023
Kefir de leite de cabra	Antidiabético: a bebida fermentada de um kefir de leite de cabra combinada com leite de soja diminuiu a glicose no plasma sanguíneo de ratos diabéticos (<i>in-vivo</i>).	Nurliyani <i>et al.</i> , 2015
Kefir de leite: bebida fermentada	Anti-hipertensivo: a bebida fermentada de um kefir de leite resultou na queda de 37 mmHg na pressão arterial sistólica e 19% de inibição da enzima conversora de angiotensina em ratos (<i>in-vivo</i>)	Amorin <i>et al.</i> , 2019

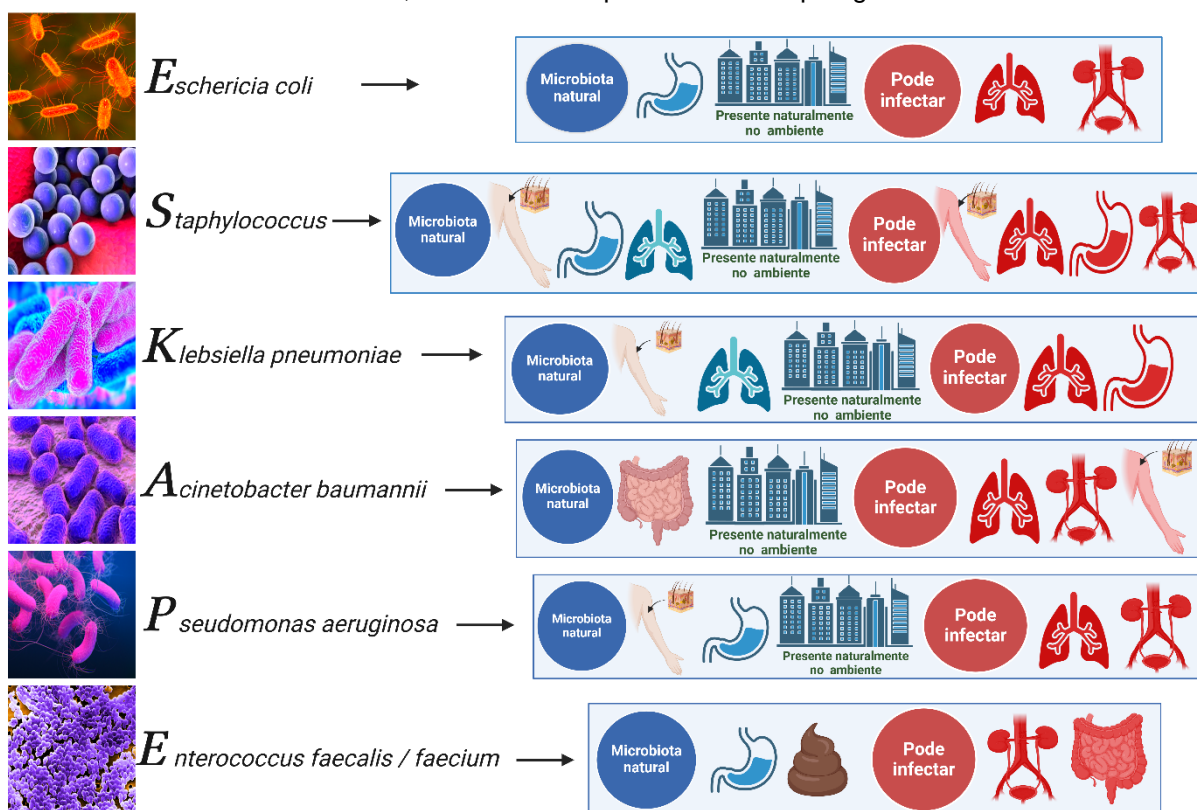
O desenvolvimento da RAM pode ocorrer através de duas maneiras, de forma natural ou adquirida. A forma natural ocorre devido ao processo adaptativo inerente aos seres vivos, onde a pressão seletiva favorece a sobrevivência dos mais resistentes. Esta condição contribui para a evolução de cepas que, através de mutações e transferência de genes, desenvolvem, linhagens super-resistentes, o que torna os fármacos convencionais ineficientes (Burki, 2018; Global antimicrobial resistance and use surveillance system report: 2022; Salam *et al.*, 2023). A resistência adquirida, se desenvolve principalmente devido à exposição prolongada de microrganismos à medicamentos previamente eficazes, nomeadamente, o uso irracional de medicamentos. Isso pode ocorrer pelo uso inadequado dos agentes farmacológicos, prescrições médicas desnecessárias, administração de doses incorretas, duração insuficiente ou demasiadamente prolongada de tratamento e erros de diagnóstico que resultam na escolha inadequada do tratamento (Burki, 2018; Global antimicrobial resistance and use surveillance system report: 2022; Salam *et al.*, 2023). A RAM é reportada principalmente na classe dos fármacos destinados ao combate de bactérias, os antibióticos.

Uma revisão publicada no ano de 2022 estimou a partir da análise de 343 milhões de casos em 204 países que 13 milhões de pessoas foram acometidas por infecções causadas por bactérias no ano de 2019, e que mais de 7 milhões vieram a óbito devido ao processos infeccioso ou por ação da resistência antimicrobiana (GBD 2019 Antimicrobial Resistance Collaborators, 2022). O governo brasileiro aponta que somente no país, o número de infecções microbianas ultrapassa os 400 mil, enquanto o número de vítimas chega a mais de 240 mil (BRASIL, 2023). A RAM além de ser um problema de saúde pública, resulta em um problema socioeconômico. O elevado tempo de estadia em um leito hospitalar para o tratamento destas infecções está intrinsecamente associado aos elevados custos de tratamento. O gasto brasileiro médio em cuidados para um paciente vítima de infecção grave ultrapassa os 10 mil dólares (COREN-SP, 2017). Surtos de infecções antimicrobianas podem também afetar gravemente a cadeia produtiva devido à incapacitação da força de trabalho provocada pelo processo infeccioso. O banco mundial alerta que até 2050, a perda econômica global para a RAM suba de 300 bilhões para mais de 20 trilhões de dólares. Em outra estimativa, é avaliado que até 2050, o número de mortes causadas por

patógenos resistentes supere os 10 milhões (Global antimicrobial resistance and use surveillance system report: 2022; Pulingam *et al.*, 2022).

Dentre as variadas espécies bacterianas, o complexo ESKAPE possui a maior atenção global. “ESKAPE” é o acrônimo que designa o grupo de bactérias responsável pela maioria dos processos infecciosos, além de apresentarem a maior prevalência de RAM no mundo (**Figura 3**) (De Oliveira *et al.*, 2020; Denissen *et al.*, 2022). O complexo ESKAPE é composto por *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e o gênero *Enterobacter spp.* (Denissen *et al.*, 2022). Em 2017, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou uma lista de 12 famílias de bactérias cujo desenvolvimento de métodos de controle é extremamente necessário. É importante ressaltar que todos os membros do complexo ESKAPE se fazem presente nesta lista, com *P. aeruginosa*, *A. baumannii* e *Enterobacter spp.* sendo classificadas pela OMS como de crítica prioridade para controle (Mancuso *et al.*, 2021).

Figura 11. Representação do complexo ESKAPE. Estas espécies de bactérias representam a maior preocupação na saúde pública global, podendo estar presentes em nossa microbiota natural, no ambiente, mas também representam risco patogênico.



Além da resistência natural e adquirida, outro problema que dificulta o combate da RAM é a falta de opções farmacológicas no mercado. Os antibióticos têm enfrentado um decréscimo em inovação produtiva nos últimos 30 anos e o uso constante das mesmas opções facilita o desenvolvimento da RAM (Baran; Kwiatkowska; Potocki, 2023). Desafios econômicos, custos elevados de pesquisa e desenvolvimento, bem como obstáculos regulatórios, contribuem para um ambiente desfavorável que desestimula e atrasa a busca por novas formulações farmacológicas (Baran; Kwiatkowska; Potocki, 2023). Os medicamentos usados no tratamento de infecções bacterianas possuem mecanismos de ação distintos. Seus efeitos possuem alvos como a parede celular (β -lactâmicos, carbapenemases); ou a inibição da replicação de DNA (fluoroquinolonas); além de inibidores proteicos; ou inibidores metabólicos (inibidores de β -lactamases, tetraciclina, Clorafenicol) (Baran; Kwiatkowska; Potocki, 2023; Mancuso *et al.*, 2021). Tais mecanismos, por serem

muito específicos em uma determinada função, facilitam o desenvolvimento da RAM (Reygaert, 2018).

2.3 Peptídeos antimicrobianos

Nos últimos anos, uma classe de moléculas vem ganhando destaque como potenciais candidatos para o desenvolvimento de antibióticos: os peptídeos antimicrobianos (PAMs) (Bin *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2022). PAMs são moléculas multifuncionais, compostas por menos de 100 resíduos de aminoácidos e são produzidos naturalmente por diversos seres vivos como animais, plantas, fungos e bactérias. Estas moléculas possuem suas atividades principalmente relacionadas ao sistema imunológico, onde atuam na defesa do corpo, embora possam também ser idealizados por softwares computacionais e sintetizados de maneira artificial (Boparai; Sharma, 2020; Li *et al.*, 2022). Com o avanço da RAM, os PAMs, obtidos de fontes naturais ou sintéticas, têm sido cada vez mais explorados e, vêm demonstrando potencial multifuncional. Dentre os efeitos já comprovados pela literatura, podemos destacar sua ação de amplo espectro contra bactérias, fungos, protozoários e vírus; além de apresentar potencial anticâncer, cicatrizante e antioxidante (He *et al.*, 2018; Luo; Song, 2021; Perez-Rodriguez *et al.*, 2022; Răileanu; Bacalum, 2023; Rojas-Pirela *et al.*, 2023). Diferentemente dos antibióticos convencionais, desenvolvidos de modo específico para atuar apenas em um alvo na célula, os PAMs têm a capacidade de interagir com patógenos por diversas formas: atuam nas membranas celulares, em organelas intracelulares e indiretamente, recrutando células do sistema imune, o que leva ao aumento da sua efetividade que resulta por fim, em uma considerável diminuição no surgimento de cepas resistentes (Rima *et al.*, 2021; Xuan *et al.*, 2023).

Os PAMS possuem características inatas que facilitam a sua ação contra microrganismos. A carga líquida positiva facilita a interação com as membranas negativas presentes em microrganismos, o que leva a um aumento da permeabilidade que pode por fim, causar o extravasamento do conteúdo celular. A hidrofobicidade confere ao peptídeo facilidade em penetrar nas membranas lipídicas dos microrganismos, para que possam posteriormente interagir contra alvos intracelulares. Já a anfipaticidade (presença simultânea de regiões hidrofílicas e hidrofóbicas), confere aos peptídeos a habilidade de formar poros ou alterar a integridade da membrana, o que provoca a destruição da célula bacteriana. Adicionalmente, a

diversidade conformacional dos peptídeos também auxilia para que essas moléculas possam atuar mais facilmente na superfície da membrana microbiana (Li *et al.*, 2022; Xuan *et al.*, 2023).

Peptídeos bioinspirados ou sintéticos podem ser alterados ou desenhados do zero (*de novo*) com o auxílio de ferramentas computacionais, visando otimizar as suas propriedades farmacológicas, reduzir a sua toxicidade, aumentar a sua seletividade ou desenhá-los para uma finalidade específica. O desenho por meio de ferramentas computacionais tem como principal objetivo simplificar o desenvolvimento de fármacos e, portanto, baratear o seu custo de produção e facilitar a sua aplicação comercial (Huang *et al.*, 2023; Ramesh *et al.*, 2016). Atualmente, o peptídeo antimicrobiano Nisin, produzido pela bactéria *Lactococcus lactis* é produzido em escala industrial, sendo usado como conservante alimentício (Li; Montalban-Lopez; Kuipers, 2018). Os peptídeos sintéticos Murepavadin e XF-73 também são cotados para serem incorporados as fileiras de medicamentos antimicrobianos e neste momento, já estão sendo avaliados de forma clínica, obtendo resultados preliminares, promissores (Dale *et al.*, 2018; Yendewa *et al.*, 2020).

Apesar da tecnologia permitir a modificação dos fármacos existentes, visando aprimorar ou melhorar suas características, isso não é o suficiente para suprir a demanda atual. Portanto, existe a necessidade de se desenvolver novas terapias medicamentosas que sejam efetivas e complexas em termos de mecanismo de ação, de modo a minimizar os casos de RAM (Liu; Stokes, 2022; Wang *et al.*, 2018). A demanda pela inovação farmacológica, aliada ao equilíbrio financeiro e sustentável, faz com que a busca por biomoléculas de fontes naturais com potencial antimicrobiano se torne atrativa para o mercado. O kefir, como uma bebida fermentada de baixo custo, comprovadamente capaz de produzir moléculas com ação antimicrobiana, como peptídeos, emerge neste cenário como um ótimo candidato para a exploração de biomoléculas com potencial aplicação terapêutica (Chong *et al.*, 2023).

3 OBJETIVOS

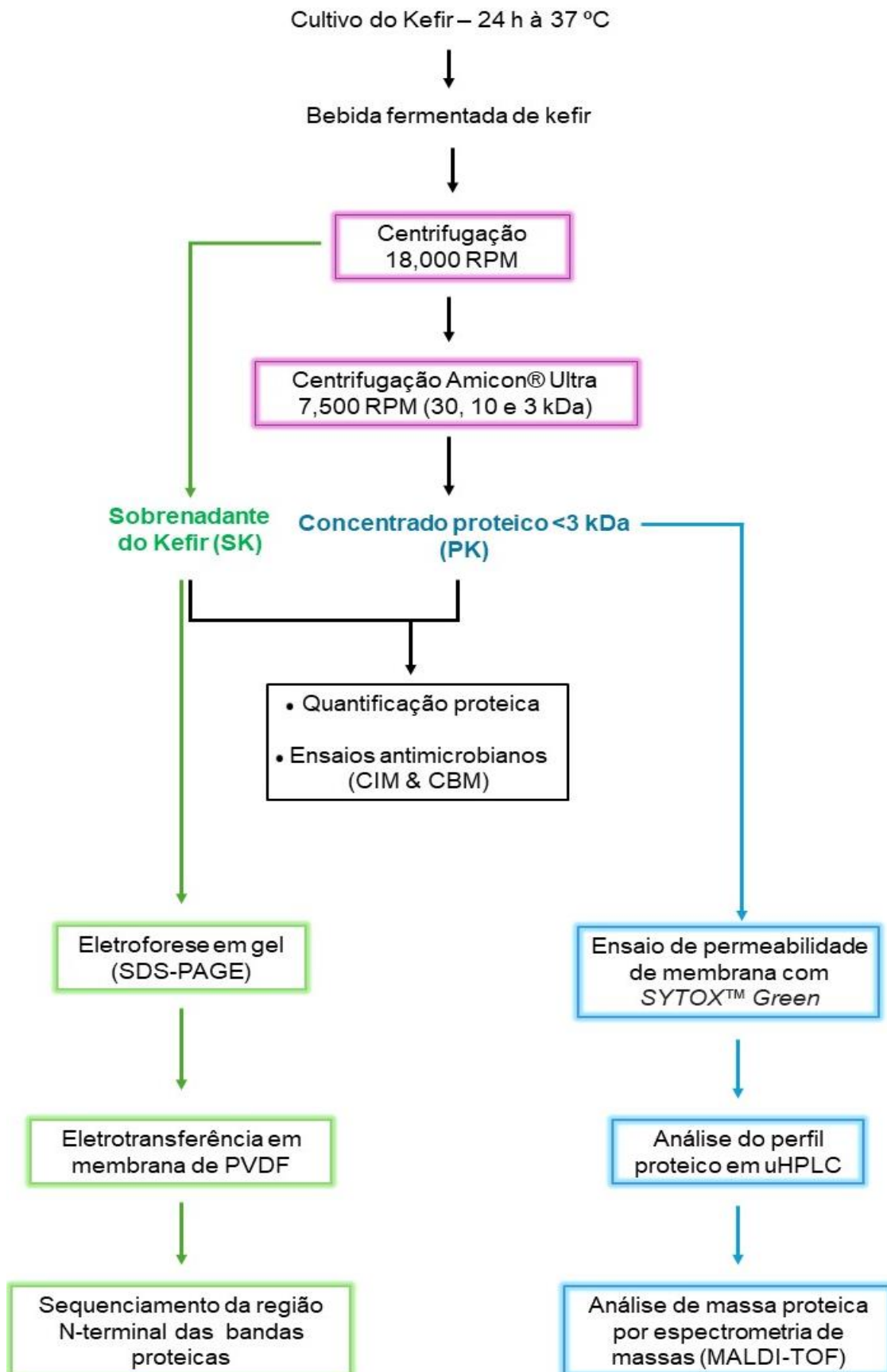
3.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil proteico e o potencial antimicrobiano de frações isoladas de um kefir a base de leite.

3.2 Objetivos específicos

- a) Quantificar proteínas presentes em uma fração do kefir;
- b) Traçar o perfil proteico através da eletroforese em gel, Cromatografia Líquida de alta Eficiência e por Espectrometria de Massas;
- c) Sequenciar a região N-terminal de proteínas do kefir;
- d) Avaliar o potencial antibacteriano de frações oriundas de um processo de filtração da bebida fermentada de um kefir de leite por meio de ensaios de concentração inibitória mínima e da concentração bactericida mínima
- e) Investigar um possível mecanismo de ação de uma fração do kefir por meio do ensaio de permeabilidade utilizando *Sytox™ Green*;

Fluxograma simplificado da metodologia de trabalho

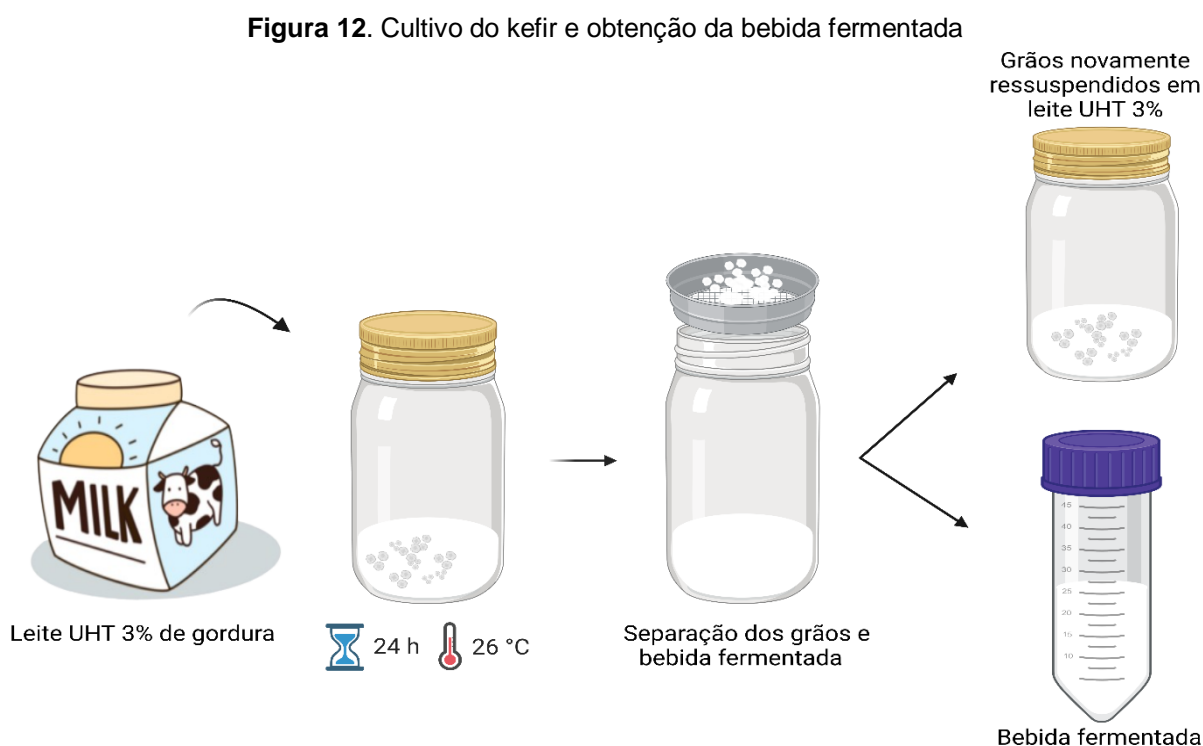


4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Purificação de Proteínas e suas Funções Biológicas (LPPFB), localizado na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campus da Cidade Universitária, Campo Grande - MS. Experimentos complementares foram também realizados em parceria com colaboradores pertencentes a outras instituições de ensino superior, nomeadamente a Universidade Católica Dom Bosco (UCDB) e a Universidade de Brasília (UNB).

4.1 Cultivo do kefir

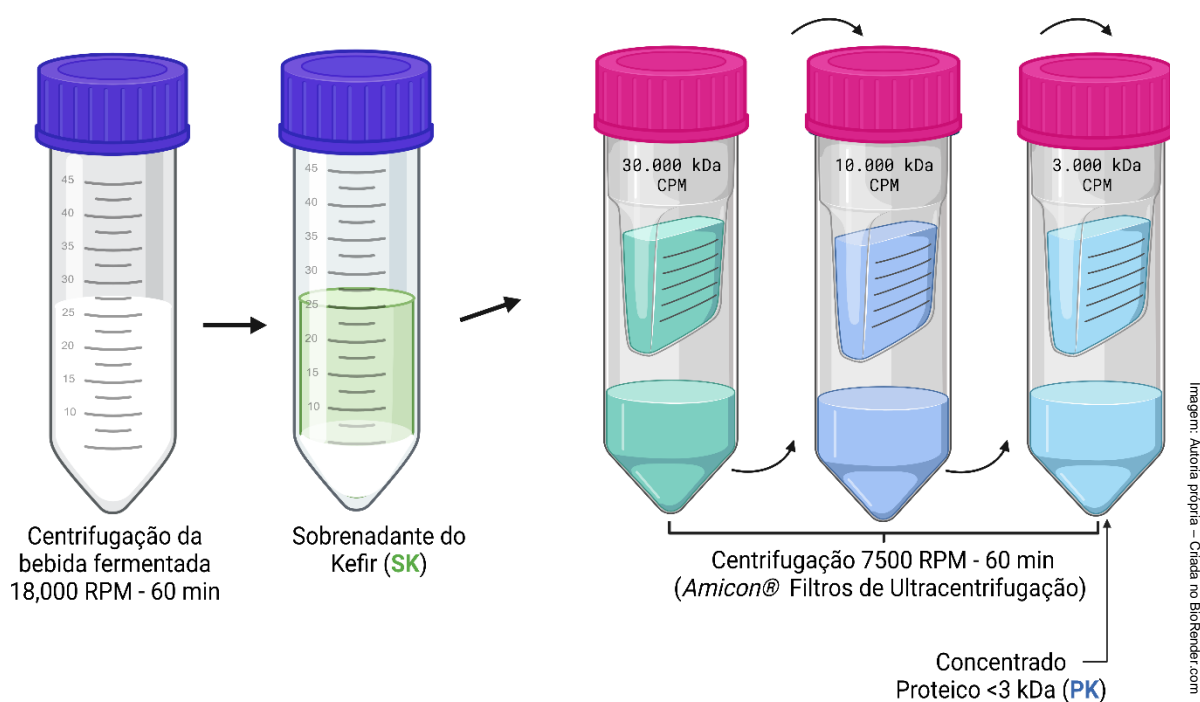
Os grãos de kefir foram obtidos por meio de doação, na cidade de Campo Grande - MS. Para o seu cultivo, os grãos foram submersos em leite bovino UHT (3% de gordura) na proporção de 10% (p/v) em um béquer de 500 mL e mantidos em estufa a 26 ± 2 °C por 24 h (**Figura 4**). A bebida resultante do processo fermentativo foi separada dos grãos com o auxílio de uma peneira de plástico fina e de malha média. Após a separação, os grãos foram submersos novamente em leite para o início de um novo processo fermentativo.



4.3 Filtragem da bebida fermentada

A bebida coletada ao fim do processo fermentativo foi separada em alíquotas de 20 mL e armazenada em tubos cônicos tipo Falcon previamente preenchidos com 1mL de ácido clorídrico 0,5mM. As amostras foram homogeneizadas em vórtex e em sequência, foram centrifugadas a 18.000 RPM por 1 h. O sobrenadante da bebida fermentada (SK) foi coletado e submetido a um novo processo de concentração de proteínas por filtros de corte baseado no peso molecular (*Amicon® Ultra Centrifugal Filters*) (**Figura 5**) (Cappione *et al.*, 2013). O processo de centrifugação ocorreu na seguinte sequência de filtros: 30, 10 e 3 kDa a 7500 RPM por 60 min. O concentrado proteico do filtro < 3kDa (PK) foi coletado, congelado em banho de gelo a $-50 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (*CB 18-40 Christ®*) e liofilizado a $-50 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (*L101 Liotop®*), sendo armazenado a -80°C para posterior uso. Amostras de SK também foram coletadas individualmente, liofilizadas e armazenadas.

Figura 13. Processo de centrifugação da bebida fermentada do kefir por meio dos filtros de ultracentrifugação Amicon®.



4.4 Quantificação de proteínas de SK e PK

A concentração de proteínas solúveis presentes na fração sobrenadante da bebida fermentada de kefir (SK) e no concentrado proteico resultante dos filtros de corte baseado no peso molecular <3 kDa (PK), foi determinada de acordo com o método de Bradford (1976). Albumina sérica bovina (*bovine serum albumin* - BSA) (*Sigma Aldrich*[®]) foi utilizada para a realização da curva padrão que variou entre 0,03 e 0,5 µg/mL. Para a quantificação da amostra, 1 mg do CPK foi solubilizado em 1 mL de água ultrapura. A quantificação foi realizada em uma placa de 96 poços. 250 µL de solução de Bradford foi adicionada nos poços contendo 5 µL das soluções proteicas (BSA e PK). O ensaio foi realizado em triplicata, e a leitura das absorbâncias foi realizada em um leitor de microplacas Varioskan LUX (*Thermo Fisher Scientific*©), a 595 nm.

4.5 Análise da atividade antibacteriana de SK e PK

4.5.1 Cultivo dos microrganismos

Para a realização dos testes microbiológicos foram utilizadas espécies bacterianas gram-positivas e gram-negativas, obtidas comercialmente e catalogadas na *American Type Culture Collection* (ATCC). São elas: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* MRSA ATCC 43300, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Salmonella enterica* ATCC 51741, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 00197, *Staphylococcus haemolyticus* ATCC 29970, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 e *Escherichia coli* KPC+ 001825971. Todas as espécies bacterianas foram armazenadas a - 80 °C em uma solução contendo caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) (*Kasvi*[®]) e glicerol a 20%. Para a ativação das bactérias, 200 µL da solução estoque bacteriana foi adicionada à 4,800 mL de caldo BHI. Os inóculos foram mantidos em estufa a 37 °C por 24 h. Para a realização dos ensaios, foi utilizado o método do crescimento direto em placa. As colônias bacterianas foram repicadas através da técnica de esgotamento por estriamento com uma alça de inoculação, em uma placa de petri com *Mueller Hinton Ágar* (MHA) (*Kasvi*[®]). A placa foi mantida em estufa a 37 °C por 24 h para crescimento.

4.5.2 Teste de concentração inibitória mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada de acordo com o método descrito pelo Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI) - M27-S4 e M07-A11, através da técnica de diluição seriada em placa de 96 poços de fundo achatado (CLSI, 1999). O PK e o SK foram preparados em uma solução estoque de 200 mg/mL diluída em caldo *Mueller Hinton* (MHC). Os poços destinados às amostras foram submetidos à diluição seriada a partir da concentração inicial (variando entre 0,19 mg/mL e 100 mg/mL). A diluição foi preparada a partir de um volume inicial de 200 µL, onde 100 µL correspondiam a solução estoque (200 mg/mL) e 100 µL de MHC.

Para a produção dos inóculos bacterianos, colônias de bactérias isoladas em MHA foram diluídas em solução estéril de NaCl 0,9%, e a densidade óptica (DO) foi estabelecida entre 0,08 e 0,1 UA, a 595 nm – o que equivale a 0,5 na escala McFarland ($1,5 \times 10^6$ UFC/mL). Posteriormente, 10 µL da suspensão bacteriana ajustada foi diluída em 4990 µL de meio MHC. Desta solução, 100 µL foi adicionado aos poços da microplaca previamente já preenchido com as amostras de SK e PK, alcançando uma concentração final no poço de $2,5 \times 10^5$ UFC/mL. O controle de esterilidade foi feito pela adição de 200 µL de MHC em uma coluna de poços. O controle de crescimento bacteriano, foi preparado em outra coluna, pela adição de 100 µL de MHC e 100 µL da solução bacteriana nos poços. Para o controle negativo de crescimento bacteriano, foi utilizada a ciprofloxacina (0,019 mg/mL – 1 mg/mL - *Sigma Aldrich*[®]), um antibiótico de amplo espectro presente no mercado e que possui ação contra as cepas utilizadas. As microplacas foram incubadas por 24 h a 37 °C e a CIM foi determinada pela menor concentração da amostra capaz de inibir de maneira visível o crescimento bacteriano (ausência de turbidez – análise visual). Três ensaios independentes em triplicata foram conduzidos.

4.5.3 Teste de Concentração bactericida mínima (CBM)

A concentração bactericida mínima (CBM) foi determinada após a obtenção do resultado do teste de CIM, para PK, SK e Ciprofloxacina (CLSI, 2018). A partir da placa de 96 poços, foram retirados 10 µL da solução do poço respectivo a CIM e dos

poços com concentrações inibitórias superiores a CIM. As alíquotas foram pipetadas de forma isolada em uma placa de MHA. O procedimento foi o mesmo para o controle de crescimento e o controle negativo do crescimento. As amostras foram incubadas por 24 h a 37 °C. As CBM das amostras foram definidas a partir da menor concentração que não permitiu nenhum crescimento visível de bactérias na placa. Três ensaios independentes em triplicata foram conduzidos.

4.6 Determinação do mecanismo de ação de PK

4.6.1 Análise quantitativa da permeabilidade de membrana por Sytox Green em leitor de microplacas

A capacidade do PK em permear a membrana plasmática de bactérias foi avaliada de acordo com a metodologia descrita por Mohanram & Bhattacharjya (2016) com modificações. A análise foi realizada de modo quantitativo através da absorção de *Sytox™ Green* (*SYTOX™ Green Nucleic Acid Stain* - 5 mM - Invitrogen™) pelas células bacterianas. *Sytox™ Green* é um marcador que tem a capacidade de permear apenas em membranas bacterianas comprometidas, e se liga aos ácidos nucleicos no interior da célula, emitindo fluorescência verde quantificável.

Os inóculos bacterianos de *S. aureus* ATCC 29213 e *S. aureus* MRSA 43300 foram preparados em uma solução de tampão fosfato de sódio (10 mM e pH 7,0) em uma densidade óptica (DO) de 0,5 a 595 nm. Para o ensaio, 280 µL desta solução foi adicionada aos poços de uma placa de 96 poços de fundo chato e cor preta. Em sequência, foram adicionados 10 µL de *Sytox™ Green* (30 µM) e após 10 min adicionou-se 10 µL de PK na concentração da CIM respectivo a cada espécie, foi adicionada aos poços. O ensaio cinético foi realizado por 240 min em agitação constante. O resultado da permeabilização da membrana pelo PK foi mensurado através da excitação (485 nm) e da emissão (520 nm) usando um leitor de microplacas Varioskan LUX. Como controle positivo de crescimento bacteriano, 300 µl da solução bacteriana foram usados. Os resultados foram expressos em percentual de absorção de *Sytox™ Green*.

4.6.2 Análise qualitativa da permeabilidade de membrana por Sytox Green por microscopia de fluorescência

O efeito do PK em permear a membrana plasmática de bactérias específicas foi também avaliada através de um ensaio de emissão de fluorescência (Almeida *et al.*, 2020). Em uma placa de 96 poços, de forma independente, células bacterianas de *S. aureus* MRSA 43300 e *S. aureus* ATCC 29213 ($1,5 \times 10^6$ UFC/mL) foram inoculadas em caldo MHC nos valores de 12,5, 25 e 50 mg/mL (CIM) do PK e a placa foi incubada por 24 h a 37 °C. Posterior a incubação, 12 µL (30 µM) de uma solução de Sytox™ Green foi adicionada aos poços e a placa foi incubada em temperatura ambiente por 15 min. Em sequência, foram preparadas lâminas com 10 µL de amostra retirados dos poços, com a solução de Sytox™ Green e bactérias. A análise das lâminas foi realizada com o auxílio de um microscópio de fluorescência de LED (*Leica DM 2000 - Leica Microsystems*©), equipado com uma câmera (*Leica DFC 7000 T - Leica Microsystems*©) e um conjunto de filtros fluorescentes para a detecção (excitação à 450-490 nm e emissão à 520 nm). A captura das imagens foi feita através do software LAS V4.12 (*Leica Microsystems*©). Três experimentos independentes em triplicata foram realizados.

4.7 Cromatografia em coluna de fase reserva em uHPLC de PK

O concentrado proteico <3 kDa (PK) obtido com o processo de centrifugação por filtros de corte, foi submetido à cromatografia líquida de ultra-eficiência (UHPLC). O sistema cromatográfico automatizado empregado foi o UltiMate 3000 UHPLC (*Thermo Fisher Scientific*©). O aparelho conta com um rack de solventes com degaseificadores (*SRD-3x00*), uma bomba dupla para a separação (*DGP-3600RS*), um injetor de amostras automático (*WPS-3000RS*), um compartimento para a coluna (*TCC-3000RS*) e dois detectores de diodo (*DAD-3000RS*). A cromatografia foi realizada em uma coluna C-18 (Promosil – 5 µm, 4,6 x 150 mm, *Agela*®) por 60 min, monitorada a 220 nanômetros (nm) e com fluxo de 1 mL/min. Para a análise, 1 mg da amostra liofilizada de PK foi ressuspensa em 200 µL de água ultrapura (*Milli-Q*®), homogeneizada em vórtex e filtrada em filtro de membrana de 0,45 µm antes da aplicação na coluna do cromatógrafo. As fases móveis utilizadas na corrida foram uma

solução A (ácido trifluoroacético) 0,1% v/v) e solução B (Acetonitrila 90% v/v). Os picos de interesse foram coletados de forma individual, em um fluxo de 1 mL/min em três análises independentes e foram posteriormente liofilizados a -50 °C e armazenados para posterior uso.

4.8 Determinação de massa específica por espectrometria de massas de PK

O perfil de massa dos picos do PK coletadas por UHPLC foi obtido por espectrometria de massa *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight - MALDI-ToF/MS (Autoflex Speed III, Bruker Daltonics, Alemanha)*. Para tal, as amostras foram misturadas em uma solução saturada de uma matriz constituída por ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (contendo 5 mg de matriz, 50 μ L de ácido trifluoroacético 3%, 250 μ L de acetonitrila e 200 μ L de água deionizada) na proporção de 1:1(v:v) diretamente sobre uma placa *Anchorchip* e deixadas cristalizar à temperatura ambiente. Os espectros de massa foram adquiridos em modo refletido positivo, mediante calibração externa utilizando o kit de calibração padrão II (*Bruker Daltonics, Alemanha*) na faixa de 700 a 3.500 m/z.

4.9 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) de SK

O perfil eletroforético do sobrenadante da bebida fermentada do kefir (SK) foi analisado pela eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), de acordo com o descrito por Laemmli (1970). O sistema eletroforético foi construído a partir de um gel de corrida de poliacrilamida de 20%, com dimensões de 6,3 x 10 cm e um gel de empilhamento de poliacrilamida de 5% com dimensões de 1,0 x 10 cm, ambos com 1,5 mm de espessura. Um volume de 20 μ L das amostras foi pipetado no gel de empilhamento, em uma proporção de solução 1:1 - sobrenadante resultante do primeiro processo de centrifugação da bebida fermentada de Kefir e tampão de amostra. Como marcador de peso molecular, o *Amersham™ ECL™ Low-Range Rainbow™ Molecular Weight Markers (Cytiva-RPN756E - 3-38 kDa)* foi utilizado. O sistema eletroforético foi submetido a uma corrida de 2 h sob as seguintes condições elétricas: 100 de voltagem e 400 de amperagem. Após a corrida, o gel foi corado com solução de *Coomassie Brilliant Blue®*

R-250 a 0,05%. Posteriormente, o excesso do corante foi removido com uma solução descorante (metanol: ácido acético glacial: água, 3:1:6, v/v/v).

4.10 Eletrotransferência em difluoreto de polivinilideno

As bandas proteicas de SK, foram submetidas ao método de eletrotransferência em membrana de difluoreto de polivinilideno (PVDF) (*Immobilon*[®]). Previamente ao processo, os papéis de blotting (*Whatman*[®]) que compõem o sistema da eletrotransferência, foram umedecidos em água ultrapura (*Milli-Q*[®]) por 10 min e uma membrana de 4,0 x 5 cm de PVDF foi umedecida por 5 min em 50 mL de metanol ultrapuro para ativação. Após a ativação da membrana de PVDF, o gel de eletroforese foi posicionado sobre a membrana e foram envolvidos por 6 folhas de papel blotting. O conjunto contendo as folhas de papel, gel e membrana de PVDF foi colocado dentro de uma cassete de eletrotransferência e submerso em uma solução de 1 L de tampão de transferência (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, SDS, 0,1% m/v, 200 mL Metanol e 800 mL água ultrapura) na cuba de eletrotransferência. Os parâmetros elétricos empregados para o procedimento foram: 25 de voltagem e 400 de amperagem por 1 h.

4.11 Determinação da sequência N-terminal

Para determinar a sequência de aminoácidos da região N-terminal da amostra centrifugada de Kefir, foi utilizado o método de degradação descrito por Edman (1950). Este procedimento opera por meio de clivagem cíclica dos aminoácidos que constituem uma proteína ou peptídeo na porção N-terminal. A amostra foi sequenciada a partir da membrana de PVDF contendo as bandas proteicas. Para isso, foi utilizado o sequenciador automático de proteínas de fase gasosa Shimadzu PPSQ-10 (*Shimadzu*©). A identificação da sequência de aminoácidos da amostra decorreu a 269 nm depois da separação em coluna C-18 (4,6 mm x 2,5 mm) sob condições isocráticas.

4.12 Análise das sequências de aminoácidos

Após o sequenciamento N-terminal, as sequências proteicas obtidas foram submetidas à análise aos bancos de dados de livre acesso, *Antimicrobial Peptide Database* (APD3) (<https://aps.unmc.edu/>), atualizado em 01/2023, *Data repository of antimicrobial peptides* (DRAMP) (<http://dramp.cpu-bioinfor.org/>), atualizado em 11/2023 e o *Database of Antimicrobial Activity and Structure of Peptides* (DBAASP) (<https://dbaasp.org/tools?page=linear-amp-prediction>) versão 3.0 (fluxo de atualização contínua) para verificar se há compatibilidade com outras sequências já publicadas em literatura (Wang; Li; Wang, 2016; Shi *et al.*, 2022; Pirtskhalava *et al.*, 2021).

5 RESULTADOS

5.1 Quantificação de proteínas solúveis

A quantificação de proteínas solúveis avaliada pelo método de Bradford (1976) está demonstrada na **Tabela 2**. Para o sobrenadante do kefir (SK), foi detectada a concentração de 44% de proteínas e para a fração <3 kDa (PK), a concentração foi de 31% de proteína.

Tabela 2. Quantificação de proteínas solúveis do sobrenadante do kefir (SK) e do concentrado proteico do kefir (PK).

Amostra	Teor de proteína (%)
SK	44,4
PK	31,3

5.2 Avaliação da atividade antibacteriana

5.2.1 Potencial antimicrobiano de SK e PK

Foi avaliada a atividade antimicrobiana de SK e PK pela técnica de microdiluição em caldo. O SK não apresentou atividade antimicrobiana perante a nenhuma espécie avaliada. A CIM e a CBM de PK perante bactérias gram-positivas e gram-negativas variaram entre 25 e 100 mg/mL, e estão apresentadas na **Tabela 3**.

Tabela 3 – Atividade antibacteriana do PK.

Cepas Bacterianas	PK (100 mg/mL)		Ciprofloxacina (1 µg/mL)		
	CIM*	CBM*	CIM	CBM	
Gram-Positivas	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	50	50	0,09	0,19
	<i>S. aureus</i> MRSA ATCC 43300	50	50	0,09	0,09
	<i>S. epidermidis</i> ATCC 00197	25	50	0,04	1,56
	<i>S. haemolyticus</i> ATCC 29970	25	50	0,04	0,04
	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	50	50	0,19	0,78
Gram-negativas	<i>E. coli</i> ATCC 35218	50	50	0,09	0,09
	<i>E. coli</i> KPC+ 001825971	50	50	>50	>50
	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	25	50	0,02	0,78
	<i>S. enterica</i> ATCC 51741	50	50	0,02	0,09
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	50	>100	0,19	0,39

* CIM = Concentração inibitória mínima; CBM = Concentração bactericida mínima

5.3 Investigação do mecanismo de ação do PK

5.3.1 Avaliação da permeabilidade da membrana bacteriana

No ensaio de emissão de fluorescência, o tratamento com a CIM de PK resultou na absorção de 73% do *Sytox™ Green* para *S. aureus* MRSA ATCC 43300 após o início do tratamento (**Figura 6**). O platô de absorção do composto ocorreu aos 40 min e, ao final do ensaio, houve um total de 90% de absorção pelas células. Já para *S. aureus* ATCC 29213, no momento inicial, a absorção do composto foi de 70% e essa absorção se manteve de forma gradativa e constante até o fim da avaliação, que resultou em um total de 99% de absorção do composto (**Figura 7**). A absorção de *Sytox™ Green* sugere que a integridade da membrana celular das bactérias foi comprometida por conta da ação de PK e indica que um dos mecanismos de ação da amostra envolve danos na membrana plasmática das espécies bacterianas avaliadas.

Figura 14. Avaliação da absorção de Sytox™ Green por *S. aureus* MRSA 43300 em leitor de microplacas Varioskan LUX através da excitação (485 nm) e da emissão (520 nm) durante 260 min de incubação.

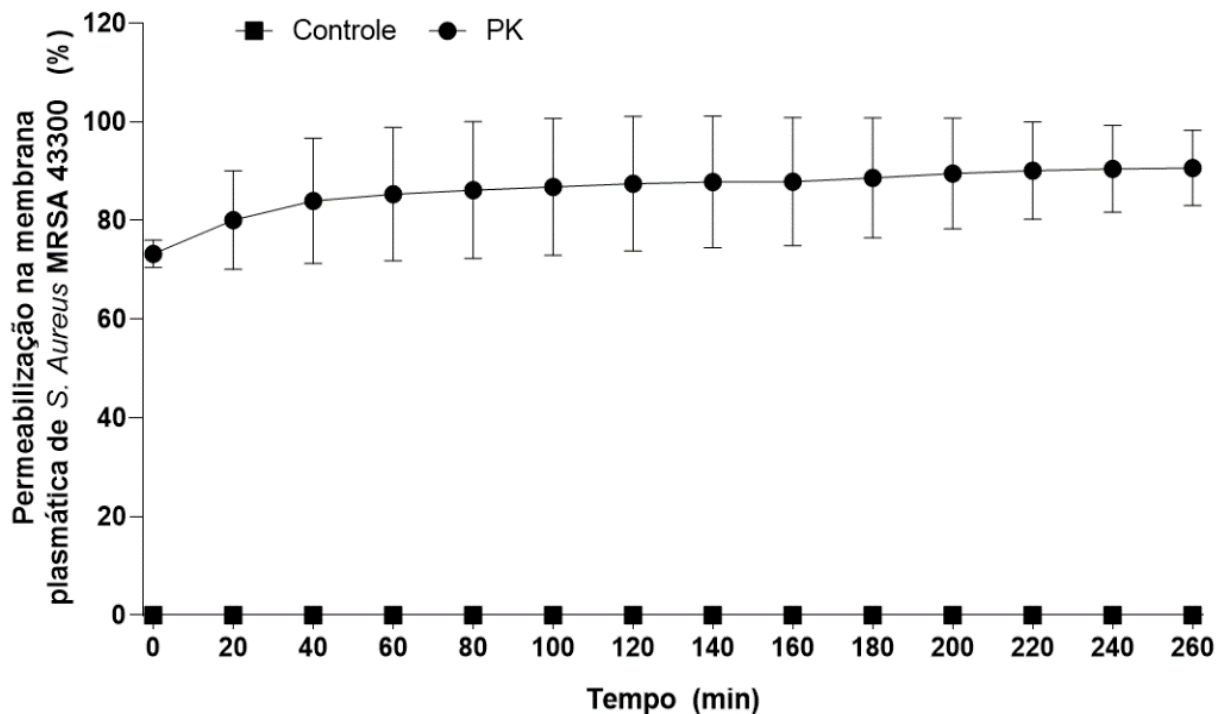
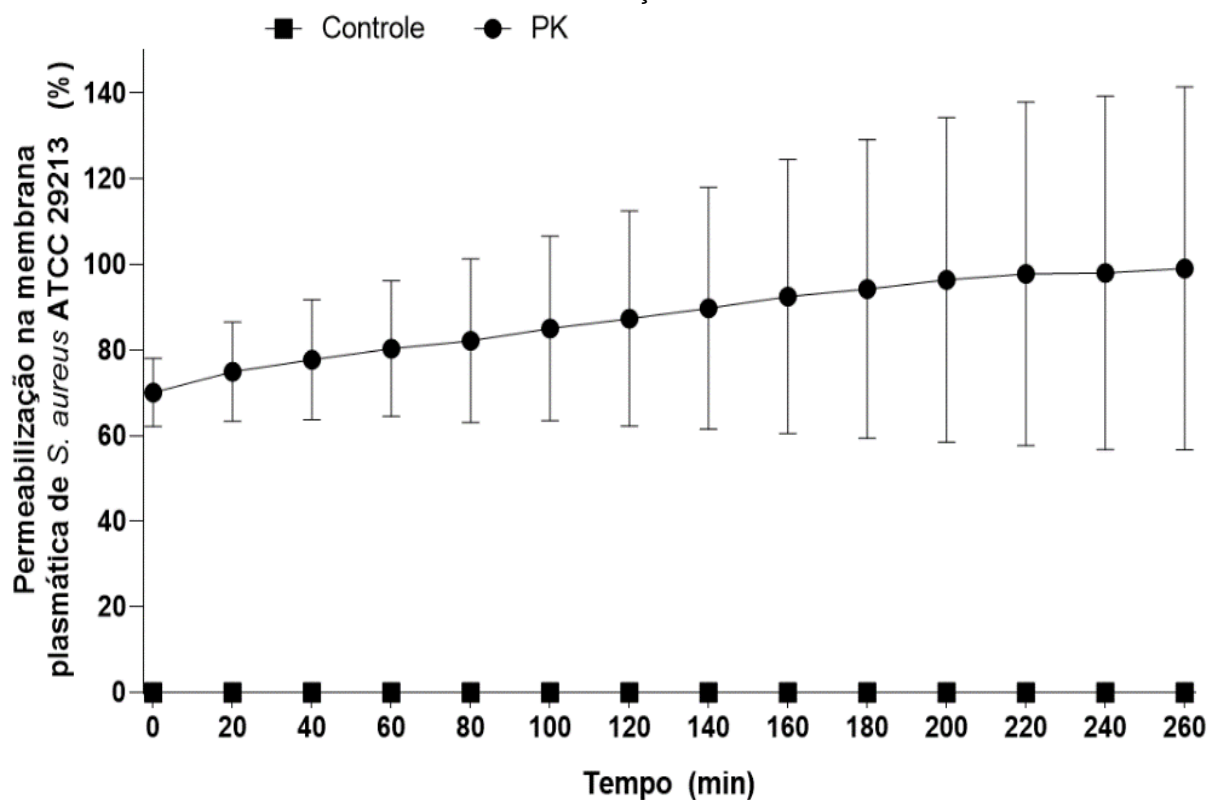


Figura 15. Avaliação da absorção de Sytox™ Green por *S. aureus* ATCC 29213 em leitor de microplacas Varioskan LUX através da excitação (485 nm) e da emissão (520 nm) durante 260 min de incubação.



5.3.2 Avaliação da permeabilidade de membrana por microscopia de fluorescência

O efeito do PK nas membranas bacterianas analisadas por meio do marcador fluorescente *Sytox™ Green*, revelou que para ambas as espécies avaliadas (**Figuras 8 e 9**), na concentração da CIM (50 mg/mL) não foram encontradas células bacterianas viáveis em ambos os campos avaliados. Porém, à medida que a concentração de PK diminui, pode-se notar a presença de células bacterianas viáveis (sem danos na membrana) no campo branco, bem como células emitindo fluorescência por absorver o *Sytox™ Green* (dano na membrana).

Figura 16. Avaliação da absorção de Sytox™ Green por *S. aureus* MRSA 43300 em microscopia de fluorescência. O PK foi incubado frente a bactéria nas concentrações de 12,5, 25 e 50 mg/mL durante 24 h. As setas vermelhas indicam bactérias com a membrana comprometida e emitindo fluorescência ocasionada pela absorção de Sytox™ Green.

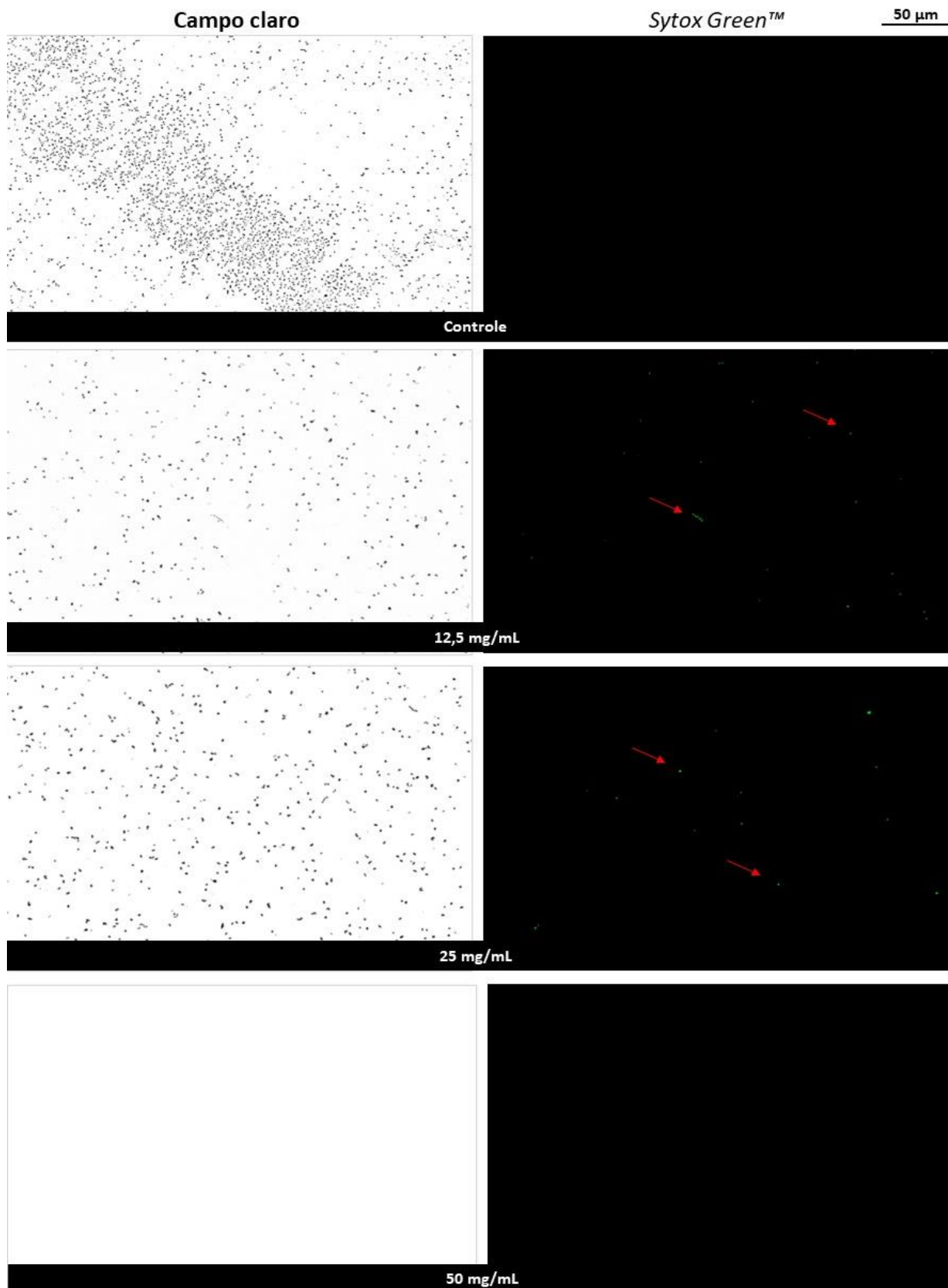
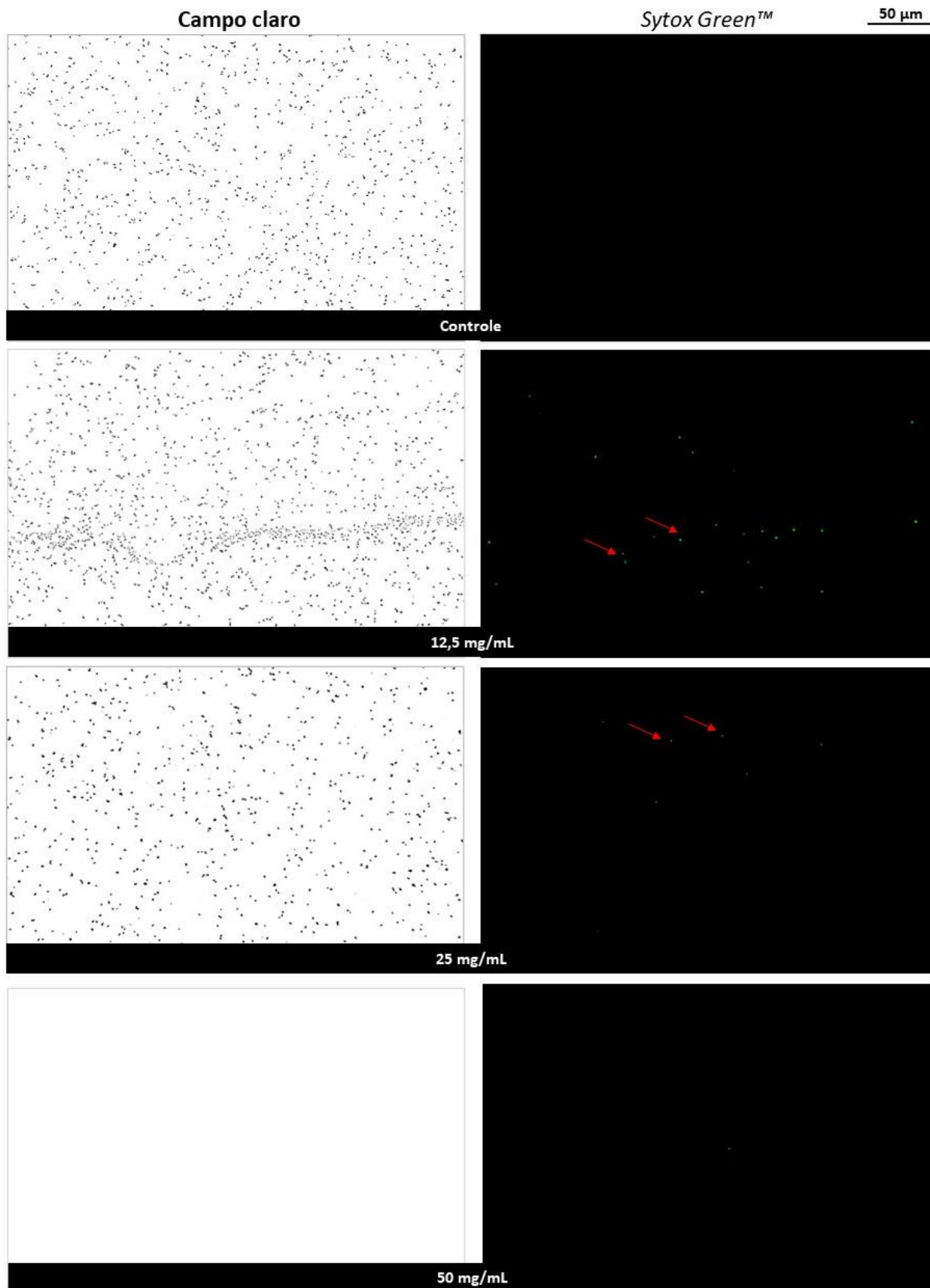


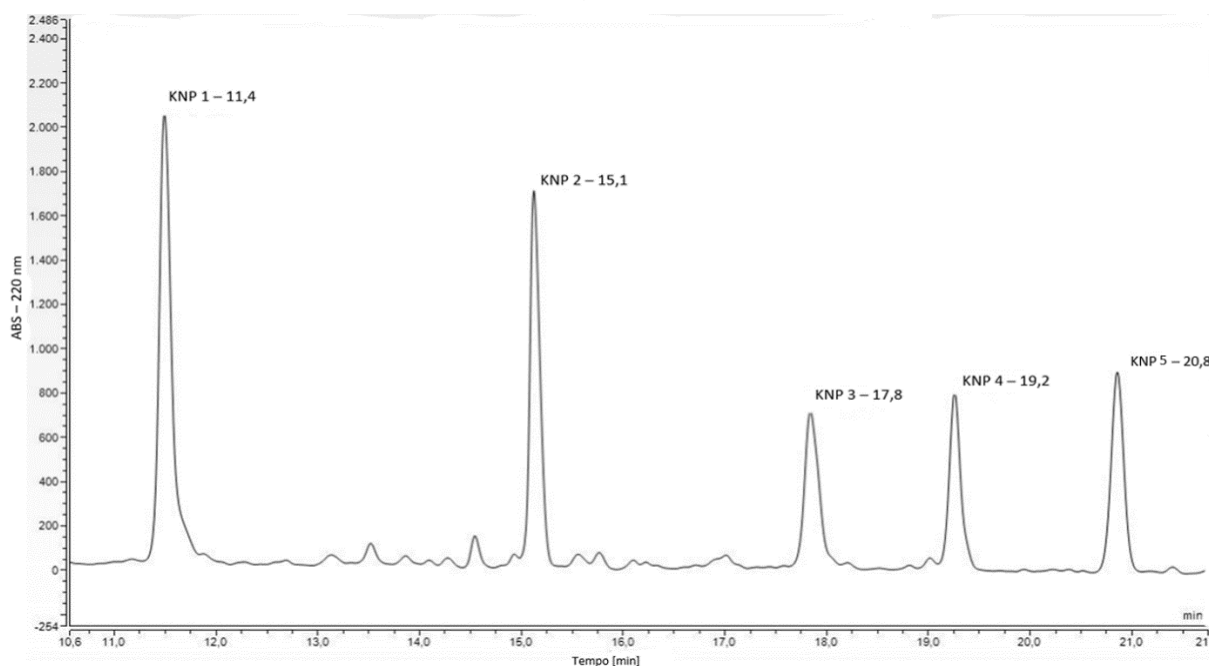
Figura 9. Avaliação da absorção de Sytox™ Green por *S. aureus* ATCC 29213 em microscopia de fluorescência. O PK foi incubado frente a bactéria nas concentrações de 12,5, 25 e 50 mg/mL durante 24 h. As setas vermelhas indicam bactérias com a membrana comprometida e emitindo fluorescência ocasionada pela absorção de Sytox™ Green.



5.4 Cromatografia líquida de alta performance

O perfil cromatográfico do PK submetido a cromatografia líquida de alta performance revelou a existência de 5 picos principais, nos respectivos tempos de 11,4 (KNP1), 15,1 (KNP2), 17,8 (KNP3), 19,2 (KNP4) e 20,8 min (KNP5) (**Figura 10**).

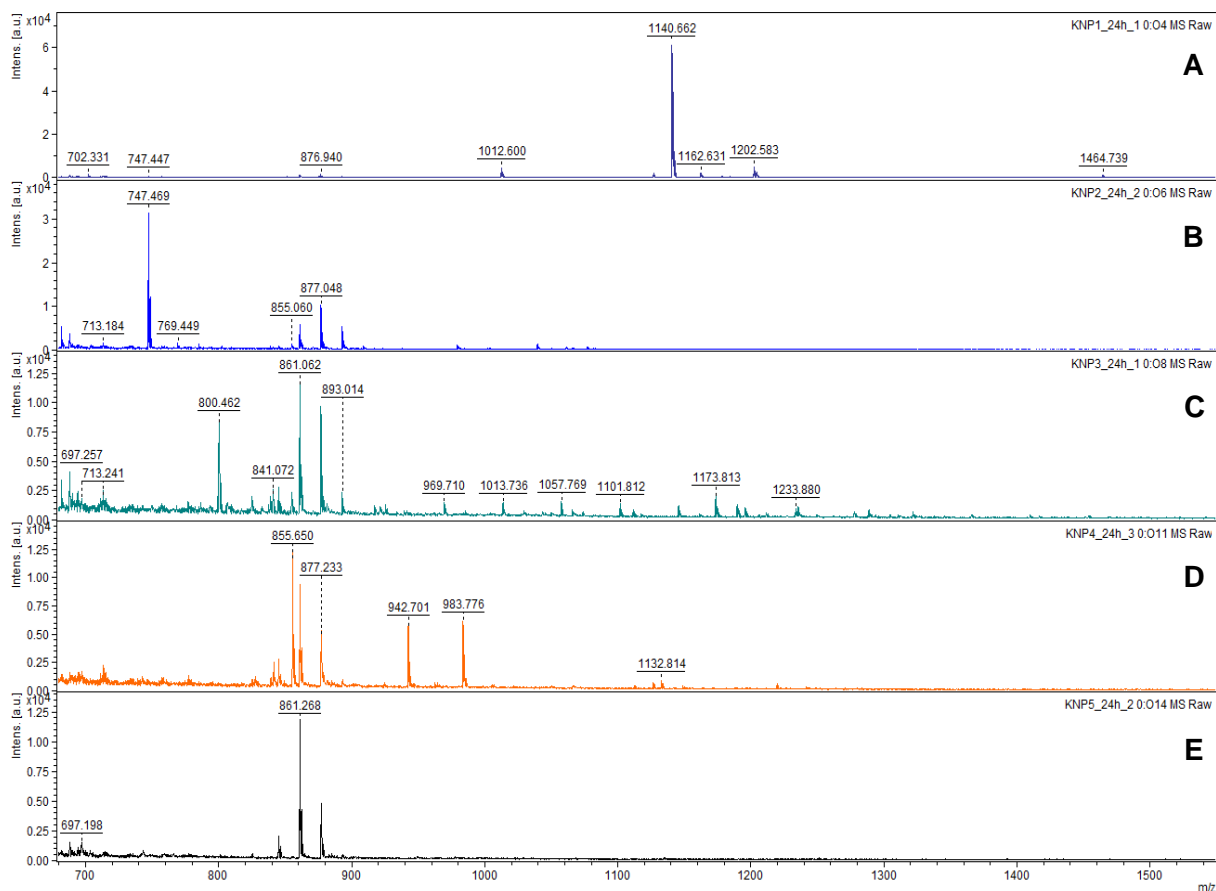
Figura 10. Perfil cromatográfico em UHPLC do PK. As frações foram coletadas em um fluxo de 1 mL/min e a detecção decorreu a 220nm.



5.5 Determinação de massa por espectrometria de massa do PK

Os perfil da espectrometria de massa dos 5 picos cromatográficos principais do PK estão representados na figura abaixo. Dos picos, pode-se identificar a massa de um total 32 moléculas. As frações KNP1 e KNP2 apresentaram dois picos de maior intensidade de sinal (**Figura 11, A e B**). Estes picos majoritários têm massa molecular igual a 11140,662 e 747,469 kDa respectivamente. Já KNP3, KNP4 e KNP5 possuem diversos picos com menor intensidade de expressão e de massa variada. Nota-se também que estas amostras compartilham 3 perfis de picos com massa e intensidade de expressão semelhante, variando de 845 a 877 kDa aproximadamente (**Figura 11, C, D, E**).

Figura 11. Espectro de massas por MALDI-TOF das frações KNP1 (A), KNP2 (B), KNP3 (C), KNP4 (D) e KNP (5) obtidos em modo refletido positivo com o uso de uma matriz constituída por ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA).



5.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A eletroforese do sobrenadante do kefir (SK) resultou na identificação de duas bandas principais de proteínas (**Figura 12**). Com base no marcador de peso molecular utilizado como referência, os pesos moleculares aparentes foram de 14 e 8 kDa aproximadamente.

5.7 Determinação da sequência N-Terminal

O sequenciamento N-terminal das bandas isoladas na eletroforese em gel resultou em duas sequências proteicas que estão demonstradas na **Tabela 4**. Na busca por sequências idênticas, as sequências identificadas no presente trabalho foram comparadas em bibliotecas específicas, mas não foram encontradas sequências semelhantes já publicadas.

Figura 12. Gel de eletroforese SDS-PAGE 20% do sobrenadante do kefir (SK). (1) representa a banda proteicas com massa aparente de 14 kDa e (2) a de 8 kDa.

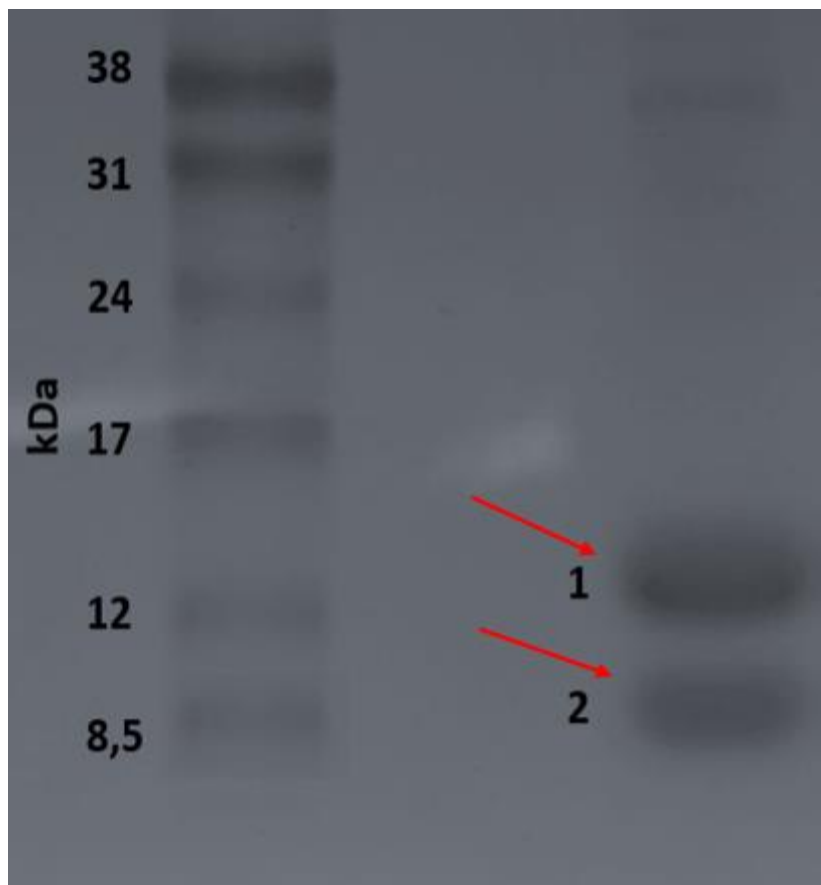


Tabela 4. Sequência de aminoácidos das bandas de massa aparente 8 e 14 kDa isoladas do SK.

Sequência N-terminal	
8 kDa	HQLTLGAMFTALAALKGARAMG
12 kDa	HIMSQSMKHLDIQF

6 DISCUSSÃO

A resistência antimicrobiana representa um risco crescente à saúde pública global e leva a morte de mais de 7 milhões de pessoas anualmente. O uso inadequado dos antibióticos, aliado à escassez de novos tratamentos, em especial que sejam eficazes contra cepas bacterianas resistentes, evidencia a necessidade de explorar alternativas terapêuticas eficientes, acessíveis e de baixo custo (Tang; Millar; Moore, 2023). O kefir é um alimento pertencente à classe dos probióticos e emerge como uma opção promissora, viável e barata para a prospecção de alternativas terapêuticas (Azizi *et al.*, 2021; Rosa *et al.*, 2017). Desta forma, neste trabalho avaliou-se o perfil proteico e o potencial antimicrobiano de frações isoladas de um kefir a base de leite. A obtenção dessas frações envolveu etapas de centrifugação com o uso de filtros de corte baseados em peso molecular. Este método possibilitou a separação e preservação da integridade da amostra, essenciais para os ensaios subsequentes, que incluíram caracterização, testes de atividade antimicrobiana e determinação do mecanismo de ação.

A confirmação do conteúdo proteico do sobrenadante do kefir (SK) e da fração <3 kDa (PK) levou à investigação mais detalhada sobre o perfil das proteínas e as aplicações microbiológicas da amostra. A fração SK foi submetida a eletroforese em gel e apresentou duas bandas proteicas bem definidas de aproximadamente 14 e 8 kDa. Dallas *et al.*, 2016 puderam identificar por meio da eletroforese 27 bandas proteicas de um kefir (10-250 kDa), sendo algumas atribuídas por eles como proteínas do leite, como α -lactoalbumina, α -caseína e β -caseína. Entretanto, as proteínas encontradas no presente trabalho não demonstraram semelhança às sequências já publicadas na literatura. A análise antimicrobiana não demonstrou sucesso para a fração SK. Este resultado negativo provavelmente está associado ao fato de que o processo de centrifugação inicial não foi suficiente para remover totalmente os carboidratos e lipídeos de SK. Estes nutrientes são inerentes a bebida do kefir sendo provável que tenham agido como substrato para o crescimento bacteriano e antagonizaram um possível efeito antimicrobiano para esta fração (González-Orozco *et al.*, 2022). Apesar do insucesso na atividade antimicrobiana, a presença de proteínas nessa fração sugere que ela possa ser investigada para outras funções biológicas. Em outro ponto de vista, a remoção de grande parte dos carboidratos e

gorduras na centrifugação faz com que ela possa vir também a ser empregada como um possível subproduto com teor calórico reduzido para enriquecimento alimentar (Krajewska; Dziki, 2023).

Assim, prosseguiu-se com o processo de purificação e concentração de SK com os filtros de corte baseados no peso molecular. A análise da fração proteica concentrada <3 kDa (PK) pela cromatografia líquida de ultra eficiência revelou a presença de 5 picos de interesse, os quais foram submetidos à análise por espectrometria de massas (MALDI-TOF). A análise por espectrometria de massas destes picos identificou a massa de um total de 31 moléculas, com tamanhos que variaram entre 700 e 1400 Da. O perfil de baixo peso molecular encontrado está de acordo com o peso de moléculas peptídicas de cadeias pequenas, que podem variar de 7 a 20 aminoácidos (Ebner *et al.*, 2015, Lehninger, 2018, Li *et al.*, 2022), e que se alinham com os dados encontrados na literatura relacionada ao kefir à base de leite. O trabalho de Ebner *et al.*, 2015, avaliou o perfil por espectrometria de massas de peptídeos oriundos de dois kefirs a base de leite provenientes de fontes distintas em Olzryn (Polônia). Foi possível identificar um total de 257 peptídeos que variaram entre 800 a 2200 Da. Amorin *et al.*, 2019 encontraram dados similares, ao determinar a massa (entre 800 a 1900 Da) de 35 peptídeos provenientes de um kefir a base de leite obtido no Espírito Santo (Brasil).

Moléculas peptídicas são encontradas na bebida do kefir de leite devido principalmente a degradação das caseínas. Esta degradação se dá pelo processo fermentativo de diferentes microrganismos que compõem os grãos (Baars *et al.*, 2023; Ebner *et al.*, 2015). Estes peptídeos também podem ser produzidos de forma natural por bactérias e leveduras, como as bactérias do gênero *Lactococcus*, *Streptococcus* e *Bacillus*, e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Li; Montalban-Lopez; Kuipers, 2018; Oliveira *et al.*, 2022; Sumi *et al.*, 2015; Thyab Gddoa Al-sahlany *et al.*, 2020; Vieira *et al.*, 2021). Estes microrganismos são componentes comuns da microbiota dos grãos de kefir, e já foram descritos em outros trabalhos de identificação, em diferentes localidades no mundo (Chong *et al.*, 2023; Prado *et al.*, 2015; Rosa *et al.*, 2017). Este fator também pode estar associado à presença dos peptídeos que identificamos neste trabalho. É importante ressaltar que o local de origem do kefir, tipo de substrato utilizado, tempo de fermentação, e as práticas de manutenção podem interferir diretamente na composição microbiológica dos grãos. Estes fatores também

podem influenciar na diversidade de moléculas com potencial uso biológico que podem ser encontradas no kefir (Chong *et al.*, 2023; González-Orozco *et al.*, 2022; Rosa *et al.*, 2017).

Os peptídeos pertencem a uma classe de biomoléculas com reconhecido e promissor potencial biológico, e podem ser uma alternativa para o desenvolvimento de novos antibióticos, em especial para o tratamento de infecções provocada por bactérias resistentes (Li *et al.*, 2022). Neste contexto, o PK foi submetido a análises para determinar sua capacidade antimicrobiana contra espécies de bactérias gram-positivas e gram-negativas. Os resultados obtidos demonstraram que o PK apresentou atividade antimicrobiana de amplo espectro, contra as 10 cepas testadas. Das espécies bacterianas avaliadas neste estudo, seis pertencem ao grupo ESKAPE. Este grupo engloba as espécies mais ameaçadoras à saúde pública e são responsáveis pelos maiores índices de resistência aos antibióticos convencionais (De Oliveira *et al.*, 2020; GBD 2019 Antimicrobial Resistance Collaborators, 2022). Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com outros trabalhos encontrados na literatura, que apresentaram a ação de peptídeos isolados do kefir de leite contra *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis* e *S. aureus in vitro* (De Lima *et al.*, 2018; Miao *et al.*, 2016a, 2016b).

Embora não existam relatos que apontem o uso direto de peptídeos antimicrobianos extraídos do kefir contra *S. epidermidis* e *S. entérica*, os trabalhos de Cevikbas *et al.*, 1994, Topuz *et al.*, 2008 e Sindi *et al.*, 2020 demonstraram o efeito antibacteriano do kefir de leite contra estas espécies por meio do método de disco-difusão. A mesma técnica também foi utilizada para comprovar o efeito do kefir de leite contra *S. haemolyticus* (AL-Kalifawi, 2015). E em outro estudo, o uso em conjunto da bebida fermentada liofilizada do kefir foi associada a um cosmético facial a base de extratos de plantas utilizado na Indonésia. A combinação entre os dois compostos apresentou maior eficiência contra *S. epidermidis* do que o próprio cosmético isolado (Fitratullah; Malaka; Maruddin, 2019).

Apesar do processo fermentativo realizado pelo microbioma do kefir gerar também subprodutos como ácidos orgânicos, álcool ou peróxido de hidrogênio, que tem capacidade natural de matar bactérias, o processo de liofilização realizado na fração de PK visou a remoção desses componentes (Marques *et al.*, 2020). Portanto, a atividade antimicrobiana observada no presente trabalho não está associada a estes

compostos. É importante ressaltar também que a atividade antimicrobiana do kefir não está relacionada somente ao pH ácido característico da bebida. Os trabalhos de Kim *et al.*, 2016 e Marques *et al.*, 2020 obtiveram resultados positivos frente a espécies bacterianas com frações do kefir de leite nas faixas de pH habituais e superiores da bebida.

A partir da confirmação do potencial antimicrobiano de PK, ensaios subsequentes para a determinação de um mecanismo de ação foram realizados em cepas de *S. aureus* MRSA 43300 e *S. aureus* 29213. As cepas foram escolhidas dada a sua importância clínica e o alto índice de resistência da espécie aos antibióticos convencionais. O mecanismo de ação analisado foi a permeabilização de membrana bacteriana, com o auxílio da sonda fluorescente SYTOX™ Green. Este fluoróforo possui a capacidade de permear apenas células que estejam com suas membranas comprometidas, não adentrando em células saudáveis. Ao entrar em contato com os ácidos nucleicos no interior das células, emite fluorescência quantificável na coloração verde (Thakur; Cattoni; Nöllmann, 2015). As bactérias tratadas com PK apresentaram aumento da emissão da fluorescência, confirmando que o efeito antibacteriano de PK está associado a promoção de danos à membrana plasmática bacteriana. Adicionalmente, as imagens de microscopia de fluorescência não apresentaram células bacterianas viáveis (analisadas na concentração de CIM de PK). Esta condição provavelmente está associada a um dano tão severo causado por PK, que as bactérias não permaneceram em condições viáveis para que a sonda pudesse emitir fluorescência. Em concentrações mais baixas de PK, foi possível observar a emissão de fluorescência, provavelmente porque as células sofreram menores danos a membrana, proporcionais a redução da concentração e mantiveram seus ácidos nucleicos íntegros. O trabalho de Miao *et al.*, 2016a também avaliou o mecanismo de ação de um peptídeo isolado do kefir do leite contra *S. aureus*. Neste trabalho, foi possível observar que o mecanismo de ação do peptídeo analisado também ocorre na membrana das células, o que foi determinado através do ensaio com o marcador colorimétrico O-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside.

Os peptídeos antimicrobianos, assim como os peptídeos encontrados no PK, podem atuar em diversos alvos. A ação na membrana celular pode se dar através da formação de poros, desintegração da membrana, formação de agregados com moléculas iônicas, e formação de agregados com moléculas lipídicas da própria

membrana, até provocarem sua disrupção, lise e conseqüentemente, morte. Estes mecanismos ocorrem dado as características naturais destas moléculas. O aspecto catiônico dos peptídeos possibilita a interação com a membrana aniônica das células bacterianas. Já a hidrofobicidade permite a inserção na membrana, o que causa a desestruturação da bicamada lipídica (Zhang; Xu; Dong, 2022).

7 CONCLUSÃO

Nossos resultados comprovaram o sucesso da filtragem e concentração proteica de uma fração da bebida fermentada de um kefir de leite. Ensaio complementares possibilitaram a confirmação de que essa fração é composta por inúmeras moléculas peptídicas. Esta fração também se provou eficaz perante a espécies bacterianas de importância clínica. Em outro ponto, obteve-se com sucesso duas sequências proteicas bem definidas de uma diferente fração deste kefir. Tais proteínas, por não apresentarem pares já publicados, demonstram então potencial para serem aplicadas principalmente em processos bioinformáticos, visando seu aprimoramento e emprego biológico futuro. Assim, os resultados positivos obtidos com as frações do kefir de leite e a importância dos microrganismos avaliados reforçam o potencial do desta bebida como probiótico e como fonte natural de biomoléculas com potencial aplicação biotecnológica.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-KALIFAWI, E. J. Anti-Bacterial Activity of the Prophet Mohammad (SWS) Drink's against Pathogenic Bacteria. **Journal of Natural Sciences Research**, Iraque, v. 5, n. 4, p. 90-98, 2015.

ALMEIDA, L. H. de O. *et al.* Adepamycin: design, synthesis and biological properties of a new peptide with antimicrobial properties. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Brasil, v. 691, p. 108487, Jan./July 2020.

AL-SHEMMARI, I. G. M.; ALTAEE, R. A. MAHDI K.; HASSAN, A. H. Evaluation of antidiabetic and antihyperlipidemic activity of Kefir in alloxan induced diabetes mellitus rat. **Scientific Journal of Medical Research**, Iraque, v. 2, n. 06, p. 83-86, Oct./Dec. 2018.

AMORIM, F. G. *et al.* Identification of new bioactive peptides from Kefir milk through proteopeptidomics: Bioprospection of antihypertensive molecules. **Food Chemistry**, Brasil, v. 282, p. 109-119, Sep./Jan. 2019.

AZIZI, N. F. *et al.* Kefir and Its Biological Activities. **Foods**, Malásia, v. 10, n. 6, p. 1210, Mar./May 2021.

BAARS, T. *et al.* Raw milk kefir: microbiota, bioactive peptides, and immune modulation. **Food & Function**, Holanda, v. 14, n. 3, p. 1648–1661, Oct./Jan. 2023.

BARAN, A.; KWIATKOWSKA, A.; POTOCKI, L. Antibiotics and Bacterial Resistance - A Short Story of an Endless Arms Race. **International Journal of Molecular Sciences**, Polônia, v. 24, n. 6, p. 5777, Jan./Mar. 2023.

BENGOA, A. A. *et al.* "Physicochemical, immunomodulatory and safety aspects of milks fermented with *Lactobacillus paracasei* isolated from kefir". **Food Research International**, Argentina, v. 123, p. 48–55, Jan./Apr. 2019.

BESSA, M. K.; BESSA, G. R.; BONAMIGO, R. R. Kefir as a therapeutic agent in clinical research: a scoping review. **Nutrition Research Reviews**, Brasil, p. 1–17, June/Mar. 2023.

BILAL, M. *et al.* Bioprospecting *Kluyveromyces marxianus* as a Robust Host for Industrial Biotechnology. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, China, v. 10, p. 851768, Jan./Apr. 2022.

BOPARAI, J. K.; SHARMA, P. K. Mini Review on Antimicrobial Peptides, Sources, Mechanism and Recent Applications. **Protein and Peptide Letters**, Índia, v. 27, n. 1, p. 4–16, May/July. 2020.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, [s. l.], v. 72, p. 248–254, 1976.

BRASIL. Governo Federal. **Dia Mundial da Sepse: Brasil tem alta taxa de mortalidade por sepse entre os países em desenvolvimento**. [Brasília]: Governo

Federal, 13 set. 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/ebserh/pt-br/hospitais-universitarios/regiao-sudeste/hu-ufjf/comunicacao/noticias/2023/dia-mundial-da-sepse-brasil-tem-alta-taxa-de-mortalidade-por-sepse-dentre-os-paises-em-desenvolvimento#:~:text=INFEC%C3%87%C3%83O,Dia%20Mundial%20da%20Sepse%3A%20Brasil%20tem%20alta%20taxa%20de%20mortalidade,entre%20os%20pa%C3%ADses%20em%20desenvolvimento&text=A%20cada%20ano%2C%20a%20sepse,morrem%2C%20um%20%C3%ADndice%20de%2060%25>. Acesso em: 05 jan. 2024.

BURKI, T. K. Superbugs: An Arms Race Against Bacteria. **The Lancet Respiratory Medicine**, [s. l.], v. 6, n. 9, p. 668, June 2018.

CAPPIONE, A. *et al.* The Amicon Pro system- a centrifugal device capable of performing all steps in the protein purification workflow. **Postepy Biochemii**, [s. l.], v. 59, n. 3, p. 327–332, 2013.

CEVIKBAS, A. *et al.* Antitumoural antibacterial and antifungal activities of kefir and kefir grain. **Phytotherapy Research**, Turquia, v. 8, n. 2, p. 78–82, Mar. 1994.

CHEN, Y.-H. *et al.* Anti-Inflammatory, Antioxidant, and Antifibrotic Effects of Kefir Peptides on Salt-Induced Renal Vascular Damage and Dysfunction in Aged Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats. **Antioxidants (Basel, Switzerland)**, China, v. 9, n. 9, p. 790, July/Aug. 2020.

CHONG, A. Q. *et al.* Fermented Beverage Benefits: A Comprehensive Review and Comparison of Kombucha and Kefir Microbiome. **Microorganisms**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. 1344, Apr./May. 2023.

CHUANG, K.-C. *et al.* Therapeutic effects of kefir peptides on adjuvant-induced arthritis in rats through anti-inflammation and downregulation of matrix metalloproteinases. **Life Sciences**, Taiwan, v. 317, p. 121411, Jan. 2023.

CLSI. Clinical and laboratory standards institute. **Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline M26-A**. Clinical and laboratory standards institute - CLSI, v. 19, n. 18, 1999.

CLSI. Clinical and laboratory standards institute. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically M07**. Clinical and laboratory standards institute - CLSI, 11^a ed. 2018.

CÔCO, L. Z. *et al.* Unravelling the Gastroprotective Potential of Kefir: Exploring Antioxidant Effects in Preventing Gastric Ulcers. **Cells**, [s. l.], v. 12, n. 24, p. 2799, Out./Dez. 2023.

COOK, M. A.; WRIGHT, G. D. The past, present, and future of antibiotics. **Science Translational Medicine**, Canadá, v. 14, n. 657, p. eabo7793, Aug. 2022.

COREN-SP. SEPSE: UM PROBLEMA DE SAÚDE PÚBLICA. A atuação e colaboração da enfermagem na rápida identificação e tratamento da doença. 3ed. São Paulo: Instituto Latino-Americano para Estudos da Sepse (ILAS), 2017.

CURCIARELLO, R. *et al.* Probiotic Lactobacilli Isolated from Kefir Promote Down-Regulation of Inflammatory Lamina Propria T Cells from Patients with Active IBD. **Frontiers in Pharmacology**, [s. l.], v. 12, p. 658026, Jan./Apr. 2021.

DALE, G. E. *et al.* Pharmacokinetics, Tolerability, and Safety of Murepavadin, a Novel Antipseudomonal Antibiotic, in Subjects with Mild, Moderate, or Severe Renal Function Impairment. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Suíça, v. 62, n. 9, p. e00490-18, Mar./July. 2018.

DALLAS, D. C. *et al.* Peptidomic analysis reveals proteolytic activity of kefir microorganisms on bovine milk proteins. **Food Chemistry**, Estados Unidos, v. 197, p. 273–284, Apr. 2016.

DE LIMA, M. D. S. F. *et al.* Brazilian Kefir-Fermented Sheep's Milk, a Source of Antimicrobial and Antioxidant Peptides. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, Brasil, v. 10, n. 3, p. 446–455, Dec. 2018.

DE OLIVEIRA LEITE, A. M. *et al.* Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. **Brazilian Journal of Microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, Brasil, v. 44, n. 2, p. 341–349, June/Sept. 2013.

DE OLIVEIRA, D. M. P. *et al.* Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, Austrália, v. 33, n. 3, p. e00181-19, May./July. 2020.

DEEN, J.; MENGEL, M. A.; CLEMENS, J. D. Epidemiology of cholera. **Vaccine**, [s. l.], v. 38, p. A31–A40, Aug. 2020.

DENISSEN, J. *et al.* Prevalence of ESKAPE pathogens in the environment: Antibiotic resistance status, community-acquired infection and risk to human health. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, África do Sul, v. 244, p. 114006, Apr./July. 2022.

EBNER, J. *et al.* Peptide profiling of bovine kefir reveals 236 unique peptides released from caseins during its production by starter culture or kefir grains. **Journal of Proteomics**, Alemanha, v. 117, p. 41–57, Nov./Jan. 2015.

EDMAN, P. A method for the determination of amino acid sequence in peptides. **Archives of Biochemistry**, [s. l.], v. 22, n. 3, p. 475, 1949.

FATAHI, A.; SOLEIMANI, N.; AFROUGH, P. Anticancer Activity of Kefir on Glioblastoma Cancer Cell as a New Treatment. **International Journal of Food Science**, Iran, v. 2021, p. 8180742, Mar. 2021.

FARAG, M. A. *et al.* The Many Faces of Kefir Fermented Dairy Products: Quality Characteristics, Flavour Chemistry, Nutritional Value, Health Benefits, and Safety. **Nutrients**, Egito, v. 12, n. 2, p. 346, Nov./Jan. 2020.

FITRATULLAH, A. M. N.; MALAKA, R.; MARUDDIN, F. In vitro Test of Kefir Mask in Combination with “Bedak Lotong”. **Advances in Environmental Biology**, Indonésia, v. 13, n. 2, p. 14–17, Nov./Feb. 2019.

Food and Agriculture Organization Probiotics in animal nutrition – Production, impact and regulation. **FAO Animal Production and Health Paper**, Roma, n. 179, 2016.

FRANCO, M. C. *et al.* Administration of kefir-fermented milk protects mice against *Giardia intestinalis* infection. **Journal of Medical Microbiology**, Argentina, v. 62, n. 12, p. 1815–1822, Sept. 2013.

GBD 2019 ANTIMICROBIAL RESISTANCE COLLABORATORS. Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. **Lancet**, Inglaterra, v. 400, n. 10369, p. 2221–2248, 2022.

GLATTER, K. A.; FINKELMAN, P. History of the Plague: An Ancient Pandemic for the Age of COVID-19. **The American Journal of Medicine**, Estados Unidos, v. 134, n. 2, p. 176–181, 2021.

GLOBAL ANTIMICROBIAL RESISTANCE AND USE SURVEILLANCE SYSTEM (GLASS) REPORT: 2022. Disponível em: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240062702>. Acesso em: 6 jan. 2024.

GONZÁLEZ-OROZCO, B. D. *et al.* Invited review: Milk kefir microbiota—Direct and indirect antimicrobial effects. **Journal of Dairy Science**, [s. l.] v. 105, n. 5, p. 3703–3715, Oct./Jan. 2022.

HAMIDA, R. S. *et al.* Kefir: A protective dietary supplementation against viral infection. **Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie**, Egito, v. 133, p. 110974, Sept./Nov. 2021.

HE, M. *et al.* Cathelicidin-Derived Antimicrobial Peptides Inhibit Zika Virus Through Direct Inactivation and Interferon Pathway. **Frontiers in Immunology**, China, v. 9, p. 722, Jan./Apr. 2018.

HUANG, J. *et al.* Identification of potent antimicrobial peptides via a machine-learning pipeline that mines the entire space of peptide sequences. **Nature Biomedical Engineering**, [s. l.], v. 7, n. 6, p. 797–810, 2023.

KIM, D.-H. *et al.* Antimicrobial Activity of Kefir against Various Food Pathogens and Spoilage Bacteria. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, Coreia do Sul, v. 36, n. 6, p. 787–790, Sept./Nov. 2016.

KRAJEWSKA, A.; DZIKI, D. Enrichment of Cookies with Fruits and Their By-Products: Chemical Composition, Antioxidant Properties, and Sensory Changes. **Molecules (Basel, Switzerland)**, [s. l.], v. 28, n. 10, p. 4005, Apr./May. 2023.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, [s. l.], v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LEHNINGER, T. M., NELSON, D. L. & COX, M. M. *Princípios de Bioquímica*. 7ª Edição, 2018. Ed. Artmed.

LI, Q.; MONTALBAN-LOPEZ, M.; KUIPERS, O. P. Increasing the Antimicrobial Activity of Nisin-Based Lantibiotics against Gram-Negative Pathogens. **Applied and Environmental Microbiology**, Holanda, v. 84, n. 12, p. e00052-18, Jan./Apr. 2018.

LI, X. *et al.* Antimicrobial Mechanisms and Clinical Application Prospects of Antimicrobial Peptides. **Molecules**, China, v. 27, n. 9, p. 2675, Mar./Apr. 2022.

LIU, G.; STOKES, J. M. A brief guide to machine learning for antibiotic discovery. **Current Opinion in Microbiology**, [s. l.], v. 69, p. 102190, 2022.

LUO, Y.; SONG, Y. Mechanism of Antimicrobial Peptides: Antimicrobial, Anti-Inflammatory and Antibiofilm Activities. **International Journal of Molecular Sciences**, China, v. 22, n. 21, p. 11401, Aug./Oct. 2021.

MANCUSO, G. *et al.* Bacterial Antibiotic Resistance: The Most Critical Pathogens. **Pathogens**, Itália, v. 10, n. 10, p. 1310, Sept./Oct. 2021.

MARQUES, V. D. *et al.* A new class of antimicrobial molecules derived from kefir, effective against *Pseudomonas aeruginosa* and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. **Scientific Reports**, Brasil, v. 10, n. 1, p. 17434, 2020.

MIAO, J. *et al.* Antibacterial Effects of a Cell-Penetrating Peptide Isolated from Kefir. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, China, v. 64, n. 16, p. 3234–3242, 2016a.

MIAO, J. *et al.* Inhibitory effects of a novel antimicrobial peptide from kefir against *Escherichia coli*. **Food Control**, China, v. 65, p. 63–72, 2016b.

MOHANRAM, H.; BHATTACHARJYA, S. Salt-resistant short antimicrobial peptides. **Peptide Science**, Singapura, v. 106, n. 3, p. 345–356, Aug./Feb. 2016.

MOURE, M. C. *et al.* Characterization of kefir yeasts with antifungal capacity against *Aspergillus* species. **International Microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology**, Argentina, v. 26, n. 2, p. 361–370, Aug./Oct. 2023.

NURLIYANI, null; HARMAYANI, E.; SUNARTI, null. Antidiabetic Potential of Kefir Combination from Goat Milk and Soy Milk in Rats Induced with Streptozotocin-Nicotinamide. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, Indonesia, v. 35, n. 6, p. 847–858, Apr./Oct. 2015.

OLIVEIRA, A. S. *et al.* Spent brewer's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a potential source of bioactive peptides: An overview. **International Journal of Biological Macromolecules**, Portugal, v. 208, p. 1116–1126, Apr./Mar. 2022.

PELUZIO, M. C. G.; DIAS, M. M.; MARTINEZ, J. A.; MILAGRO, F. Kefir and Intestinal Microbiota Modulation: Implications in Human Health. **Frontiers in Nutrition**, [s. l.], v. 8, p. 638740, Dec./Feb. 2021

PEREZ-RODRIGUEZ, A. *et al.* Antimicrobial Peptides which Anti-Candida Activity. **International Journal of Molecular Sciences**, Espanha, v. 23, n. 16, p. 9264, July/Aug. 2022.

PIQUÉ, N.; BERLANGA, M.; MIÑANA-GALBIS, D. Health Benefits of Heat-Killed (Tyndallized) Probiotics: An Overview. **International Journal of Molecular Sciences**, Espanha, v. 20, n. 10, p. 2534, Apr./May. 2019.

PIRTSKHALAVA, M. *et al.* DBAASP v3: database of antimicrobial/cytotoxic activity and structure of peptides as a resource for development of new therapeutics. **Nucleic Acids Research**, Rússia, v. 49, p. 288-297, Sept./Oct. 2021.

PRADO, M. R. *et al.* Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 2015. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2015.01177/abstract>. Acesso em: 25 dez. 2023.

PULINGAM, T. *et al.* Antimicrobial resistance: Prevalence, economic burden, mechanisms of resistance and strategies to overcome. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Malásia, v. 170, p. 106103, Aug./Dec. 2022.

RĂILEANU, M.; BACALUM, M. Cancer Wars: Revenge of the AMPs (Antimicrobial Peptides), a New Strategy against Colorectal Cancer. **Toxins**, Romênia, v. 15, n. 7, p. 459, June/July. 2023.

RAMESH, S. *et al.* Short AntiMicrobial Peptides (SAMPs) as a class of extraordinary promising therapeutic agents. **Journal of Peptide Science: An Official Publication of the European Peptide Society**, África do Sul, v. 22, n. 7, p. 438–451, Feb./Apr. 2016.

REYGAERT, W. C. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. **AIMS Microbiology**, Estados Unidos, v. 4, n. 3, p. 482–501, Apr./June. 2018.

RIBEIRO DA CUNHA; FONSECA; CALADO. Antibiotic Discovery: Where Have We Come from, Where Do We Go? **Antibiotics**, Portugal, v. 8, n. 2, p. 45, Apr. 2019.

RIMA, Mariam *et al.* Antimicrobial Peptides: A Potent Alternative to Antibiotics. **Antibiotics**, França, v. 10, n. 9, p. 1095, Aug./Sept. 2021.

RODRIGUES, K. L. *et al.* A novel beer fermented by kefir enhances anti-inflammatory and anti-ulcerogenic activities found isolated in its constituents. **Journal of Functional Foods**, Brasil, v. 21, p. 58–69, Sept./Nov. 2016.

ROJAS-PIRELA, M. *et al.* Antimicrobial Peptides (AMPs): Potential Therapeutic Strategy against Trypanosomiasis? **Biomolecules**, Chile, v. 13, n. 4, p. 599, Jan./Mar. 2023.

ROSA, D. D. *et al.* Milk kefir: nutritional, microbiological and health benefits. **Nutrition Research Reviews**, Brasil, v. 30, n. 1, p. 82–96, 2017.

SALAM, Md. A. *et al.* Antimicrobial Resistance: A Growing Serious Threat for Global Public Health. **Healthcare**, Malásia, v. 11, n. 13, p. 1946, Apr./July. 2023.

SHARIFI, M. *et al.* Kefir: a powerful probiotics with anticancer properties. **Medical Oncology (Northwood, London, England)**, Irã, v. 34, n. 11, p. 183, June/Sep 2017.

SILVA, D. R. *et al.* Probiotics as an alternative antimicrobial therapy: Current reality and future directions. **Journal of Functional Foods**, Brasil, v. 73, p. 104080, Dec./June. 2020.

SINDI, A. *et al.* Antimicrobial Activity of Six International Artisanal Kefirs against *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis, and *Staphylococcus aureus*. **Microorganisms**, Rússia, v. 8, n. 6, p. 849, Apr./June. 2020.

SNIGDHA, S. *et al.* Probiotics: Potential novel therapeutics for microbiota-gut-brain axis dysfunction across gender and lifespan. **Pharmacology & Therapeutics**, Estados Unidos, v. 231, p. 107978, 2022.

SUMI, C. D. *et al.* Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: a new era for antibiotics. **Canadian Journal of Microbiology**, Rússia, v. 61, n. 2, p. 93–103, Apr./June. 2015.

TAN, S.; TATSUMURA, Y. Alexander Fleming (1881–1955): Discoverer of penicillin. **Singapore Medical Journal**, [s. l.], v. 56, n. 07, p. 366–367, 2015.

TANG, K. W. K.; MILLAR, B. C.; MOORE, J. E. Antimicrobial Resistance (AMR). **British Journal of Biomedical Science**, Reino Unido, v. 80, p. 11387, Mar./June. 2023.

THAKUR, S.; CATTONI, D. I.; NÖLLMANN, M. The fluorescence properties and binding mechanism of SYTOX green, a bright, low photo-damage DNA intercalating agent. **European biophysics journal: EBJ**, França, v. 44, n. 5, p. 337–348, Dec./May. 2015.

THYAB GDDOA AL-SAHLANY, S. *et al.* Purification of Bioactive Peptide with Antimicrobial Properties Produced by *Saccharomyces cerevisiae*. **Foods**, Iraque, v. 9, n. 3, p. 324, Feb./Mar. 2020.

TOPUZ, E. *et al.* Effect of oral administration of kefir on serum proinflammatory cytokines on 5-FU induced oral mucositis in patients with colorectal cancer. **Investigational New Drugs**, Turquia, v. 26, n. 6, p. 567–572, June/Sept. 2008.

UDDIN, T. M. *et al.* Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. **Journal of Infection and Public Health**, Índia, v. 14, n. 12, p. 1750–1766, Aug./Oct. 2021.

VIEIRA, C. P. *et al.* Bioactive Compounds from Kefir and Their Potential Benefits on Health: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, Brasil, v. 2021, p. 1–34, May./Oct. 2021.

WANG, G.; LI, X.; WANG, Z. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. **Nucleic Acids Research**, Estados Unidos, v. 44, n. D1, p. D1087–D1093, Oct./Nov. 2016.

WANG, J. *et al.* Antimicrobial peptides: Promising alternatives in the post feeding antibiotic era. **Medicinal Research Reviews**, China, v. 39, n. 3, p. 831–859, Apr./Sept. 2018.

XUAN, J. *et al.* Antimicrobial peptides for combating drug-resistant bacterial infections. **Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy**, China, v. 68, p. 100954, Jan./Mar. 2023.

YADAV, M. K. *et al.* Probiotics, prebiotics and synbiotics: Safe options for next-generation therapeutics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, India, v. 106, n. 2, p. 505–521, July./Oct. 2022.

YANG, H. *et al.* The impact of dietary fiber and probiotics in infectious diseases. **Microbial Pathogenesis**, China, v. 140, p. 103931, Sept./Dec. 2020.

YENDEWA, G. A. *et al.* A two-part phase 1 study to establish and compare the safety and local tolerability of two nasal formulations of XF-73 for decolonisation of *Staphylococcus aureus*: A previously investigated 0.5mg/g viscosified gel formulation versus a modified formulation. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, Estados Unidos, v. 21, p. 171–180, Apr./Oct. 2020.

YILMAZ-ERSAN, L. *et al.* The Antioxidative Capacity of Kefir Produced from Goat Milk. **International Journal of Chemical Engineering and Applications**, Turquia, v. 7, p. 22–26, Jan./Apr. 2016.

ZHANG, R.; XU, L.; DONG, C. Antimicrobial Peptides: An Overview of their Structure, Function and Mechanism of Action. **Protein & Peptide Letters**, China, v. 29, n. 8, p. 641–650, 2022.