

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CAROLINE PEREIRA DE ARAUJO

PÓS-BIÓTICOS VERSUS FUNGOS: AVALIAÇÃO INIBITÓRIA *in vitro* DAS
LEVEDURAS *Candida glabrata* E *Cryptococcus neoformans*.

BRASÍLIA

2024

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

PA663p Pereira de Araujo, Caroline
PÓS-BIÓTICOS VERSUS FUNGOS: AVALIAÇÃO INIBITÓRIA in vitro
DAS LEVEDURAS Candida glabrata E Cryptococcus neoformans /
Caroline Pereira de Araujo; orientador Yanna Karla de
Medeiros Nobrega; co-orientador Fabiana Brandão. --
Brasília, 2024.
100 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) --
Universidade de Brasília, 2024.

1. Candida glabrata. 2. Cryptococcus neoformans. 3.
Lactobacillus spp.. 4. Coadjuvante Terapêutico. 5.
Pós-bióticos. I. de Medeiros Nobrega, Yanna Karla , orient.
II. Brandão, Fabiana, co-orient. III. Título.

CAROLINE PEREIRA DE ARAUJO

PÓS-BIÓTICOS VERSUS FUNGOS: AVALIAÇÃO INIBITÓRIA *in vitro* DAS
LEVEDURAS *Candida glabrata* E *Cryptococcus neoformans*.

Dissertação de Mestrado apresentada ao
programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da
Saúde, Universidade de Brasília, como requisito
parcial à obtenção do título de Mestre em
Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dra. Yanna Karla de Medeiros
Nobrega.

Coorientador: Prof. Dra. Fabiana Brandão

BRASÍLIA

2024

CAROLINE PEREIRA DE ARAUJO

PÓS-BIÓTICOS VERSUS FUNGOS: AVALIAÇÃO INIBITÓRIA *in vitro* DAS LEVEDURAS *Candida glabrata* E *Cryptococcus neoformans*.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 29 de janeiro de 2024

BANCA EXAMINADORA

PRESIDENTE:

Prof. Dra. Yanna Karla de Medeiros Nobrega.
Universidade de Brasília (UnB)

MEMBROS:

Prof. Dr. Rafael Santos Santana
Universidade de Brasília (UnB)

Prof. Dra. Fernanda Guilhelmelli Costa
Membro Externo do Programa

Prof. Dra. Tanise Vendruscolo Dalmolin - SUPLENTE
Universidade de Brasília (UnB)

AGRADECIMENTOS

“Feliz do homem que encontra a sabedoria, daquele que adquiriu a inteligência”.
(Provérbios 3,13)

Nesses anos de mestrado foram de muitos estudos, desesperos e alegrias. Portanto, gostaria de agradecer primeiramente a Deus, muito obrigada, Tu és o Deus do impossível, obrigado por tudo, por sempre está comigo, por não me abandonar, por me capacitar, por não me deixar que desistisse mesmo nos piores momentos e por sempre me inspirar. Obrigada a São Miguel dos anjos da guarda por sempre me proteger e a Nossa Senhora e ao Beato Carlo Acutis por nunca deixarem de interceder por mim, por me darem fé e força necessária para enfrentar as dificuldades e nunca desistir. Não poderia nunca deixar de agradecer a todos os grupos das Mães que oram pelos filhos de Cafarnaum, por todas as orações que fizeram e todos os pedidos de intercessão a Nossa Senhora da Salette.

Obrigada, Mãe, Vó e Tia Nem por serem as minhas maioríssimas fãs e sempre acreditarem no meu potencial mesmo eu não acreditando. Mãe eu sei que tudo que a Senhora abriu mão para eu estar aqui hoje, não tem palavras, nem frases e nem atos que possam demonstrar o tamanho do meu agradecimento e do meu amor. Te Amo mais!

Um obrigada muito mais que especial aos meus amigos, principalmente a Thalita, Lili (minha irmã), Dri, Jeff, Alê e também aos pais da Thalita, Ricardo e Antônia que me acolherem como filha, a Ester, Débora e Keren por me acolherem como irmã, obrigada por tudo, sem vocês não conseguiria fazer nada, obrigada por sempre estarem ao meu lado me apoiando, me dando muito carinho e amor. Amo vocês.

Nunca poderia deixar de agradecer a minha orientadora Professora Dra. Fabiana Brandão, a senhora sabe que eu não sou de elogiar e nem de agradecer com palavras bonitas e chiques, então, obrigada por todos os ensinamentos, conselhos e orientação neste árduo percurso acadêmico. A senhora é incrível, e pessoas incríveis fazem coisas extraordinárias, mesmo ninguém acreditando nelas.

Gostaria de agradecer a Universidade de Brasília, Capes e a todo o LabMic, a Prof. Yanna que abriu as portas do laboratório para me receber, a Carol e Rô por toda ajuda e ensinamentos, Rô obrigada de coração por cada conselho. Um agradecimento especial a

Prof. Pérola de Oliveira Magalhães por abrir o seu laboratório e nos permitir utilizar os equipamentos para realização desse trabalho,

Fazer uma pós-graduação sempre é um desafio e iniciar um mestrado em plena pandemia, no cenário político que estávamos, com uma ciência sendo desvalorizada e atacada todos os dias, foi um desafio muito maior e constante. Por isso, obrigada para todos aqueles que de uma forma direta ou indireta, sempre acreditam na ciência e que a educação sempre é a resposta e a forma de mudar o mundo para um mundo melhor. Como Nelson Mandela falava “A educação é a arma mais poderosa que você pode usar para mudar o mundo”.

A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.

Arthur Schopenhauer

RESUMO

Araujo, Caroline Pereira. **Pós-bióticos versus fungos: avaliação inibitória *in vitro* das leveduras *Candida glabrata* e *Cryptococcus neoformans*.** Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2024.

Introdução: Estudos recentes apontam como abordagem promissora o uso dos pró e pós-bióticos, por serem capazes de inibir/diminuir o crescimento de determinados micro-organismos patogênicos, além de apresentarem um impacto sobre a seleção de linhagens resistentes a antimicrobianos significativamente menor. Somado ao problema do aumento incontrolável da resistência microbiana, atualmente, constata-se uma notável escassez de agentes antifúngicos disponíveis para o tratamento clínico. Neste cenário, segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), as leveduras de *Candida glabrata* e *Cryptococcus neoformans* figuram entre as espécies de fungos com riscos alarmantes à saúde humana. **Objetivo:** Avaliar o efeito dos pós-bióticos de *Lactobacillus* spp. e do ácido graxo de cadeia curta, Butirato de sódio, sobre crescimento das leveduras patogênicas *C. glabrata* e *C. neoformans*. **Metodologia:** Foram realizadas curvas de crescimento seguindo o protocolo de Concentração Inibitória Mínima (CIM), padronizados de acordo o Comitê Brasileiro de Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (BrCAST) para ensaio de microdiluição em caldo, com adaptações. Os pós-biótico foram coletados a partir do crescimento isolado das espécies de *Lactobacillus casei* Shirota, *L. casei*, *L. reuteri* e *L. rhamnosus*, culturas puras e frescas, centrifugadas e posteriormente filtradas com filtro de membrana estéreis. Os meios utilizados para os ensaios de CIM foram: YM (Malte de Leveduras), Sabouraud, MM (Meio Condicionado) e RPMI 1640, acrescidos dos pós-bióticos espécie-específica de *Lactobacillus* spp. (LAC) (v / v), seguindo diluição seriada. **Resultados:** Os dados deste estudo demonstraram redução do crescimento de ambas as leveduras na presença dos pós-bióticos, com efeito dose-dependente. Dependendo do meio de cultivo aplicado ou da espécie de *Lactobacillus* no teste de CIM o efeito do pós-biótico também variou. Em Sabouraud e YM, na concentração de 50%, o pós-biótico de *L. reuteri* reduziu o crescimento de *C. glabrata*. Em RPMI, na presença dos 4 pós-bióticos testados, houve redução do crescimento de *C. glabrata* em todas as concentrações avaliadas. Os dados referentes a *C. neoformans* demonstraram uma redução de crescimento com 50% dos pós-bióticos de *L. casei* e *L. rhamnosus* em Sabouraud. O pós-biótico de *L. Reuteri* em Sabouraud e YM também reduziu o crescimento de *C. neoformans*. Nos meios RPMI e MM, na presença dos 4 pós-bióticos, houve redução do crescimento de *C. neoformans* em todas as concentrações testadas. Para o NaBut em Sabouraud, houve redução do crescimento de *C. glabrata* em todas as

concentrações, mas em RPMI não houve redução. Nos ensaios para *C. neoformans*, NaBut apresentou redução em Sabouraud e RPMI. **Conclusão:** Tanto os pós-bióticos de *Lactobacillus* spp. quanto o NaBut foram capazes de reduzir o crescimento *in vitro* de leveduras patogênicas de modo dose-dependente, observando que para os *Lactobacillus* o efeito é espécie-específico. Embora sejam necessários estudos complementares, os dados preliminares apontam que os pós-bióticos apresentam efeito inibitório sobre as leveduras e no futuro poderão ser empregados como abordagem complementar aos tratamentos atuais. Além de possuírem a vantagem de menor impacto na seleção de linhagens resistentes aos antifúngicos, economicidade e possibilidade de oferta em regiões de vulnerabilidade econômica.

Palavras-chave: *Candida glabrata*, *Cryptococcus neoformans*, *Lactobacillus* spp., Coadjuvante Terapêutico, Pós-bióticos, Prebióticos.

ABSTRACT

Araujo, Caroline Pereira. **Postbiotics versus fungi: in vitro inhibitory evaluation of the yeasts *Candida glabrata* and *Cryptococcus neoformans***. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2024.

Abstract: Recent studies highlight the promising approach of using pre- and postbiotics due to their capability to inhibit/reduce the growth of specific pathogenic microorganisms, along with a significantly lower impact on the selection of antimicrobial-resistant strains. In addition to the uncontrollable increase in microbial resistance, there is currently a notable scarcity of antifungal agents available for clinical treatment. In this context, according to data from the World Health Organization (WHO), *Candida glabrata* and *Cryptococcus neoformans* yeasts are among the fungal species posing alarming health risks. **Objective:** To assess the effect of *Lactobacillus* spp. postbiotics and the short-chain fatty acid sodium butyrate on the growth of pathogenic yeasts *C. glabrata* and *C. neoformans*. **Methodology:** Growth curves following the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) protocol, adapted according to the Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCAST) for microdilution assays. Postbiotics were collected from isolated cultures of *Lactobacillus casei*, *L. casei*, *L. reuteri*, and *L. rhamnosus*, pure and fresh cultures, centrifuged, and subsequently sterile-filtered. MIC assays were conducted in various media, including YM (Yeast Malt), Sabouraud, MM (Conditioned Medium), and RPMI 1640, with species-specific *Lactobacillus* (LAC) postbiotic dilutions. **Results:** The study demonstrated a dose-dependent reduction in the growth of both yeasts in the presence of postbiotics. The effectiveness varied with the culture medium or *Lactobacillus* species in the MIC assay. In Sabouraud and YM, at a 50% concentration, *L. reuteri* postbiotics reduced *C. glabrata* growth. In RPMI, all tested postbiotics led to a reduction in *C. glabrata* growth across all concentrations. Regarding *C. neoformans*, a 50% reduction in growth was observed with postbiotics from *L. casei* and *L. rhamnosus* in Sabouraud. *L. reuteri* postbiotics in Sabouraud and YM also reduced *C. neoformans* growth. In RPMI and MM, the presence of all four postbiotics led to a reduction in *C. neoformans* growth across all tested concentrations. Sodium butyrate reduced *C. glabrata* growth in Sabouraud at all concentrations, but no reduction was observed in RPMI. For *C. neoformans*, sodium butyrate exhibited a reduction in both Sabouraud and RPMI assays. **Conclusion:** both *Lactobacillus* spp. postbiotics and sodium butyrate effectively reduced the in vitro growth of pathogenic yeasts, with *Lactobacillus* postbiotics showing species-specific effects. While further studies are needed, these preliminary findings suggest that postbiotics may serve as a complementary approach to current treatments,

offering advantages such as reduced impact on antifungal resistance selection, cost-effectiveness, and potential availability in economically vulnerable regions.

Keywords: *Candida glabrata*, *Cryptococcus neoformans*, *Lactobacillus* spp., therapeutic adjuvant, Postbiotics, Prebiotics

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Definições de Probióticos, Pós-bióticos e Prebióticos.....	26
Figura 2 - Funções dos Pós-bióticos.....	29
Figura 3 - Preparação do CIM.....	36
Figura 4 - Desenho da Placa de pós-bióticos de <i>Lactobacillus</i>	38
Figura 5 - Desenho da Placa de NaBut.....	40
Figura 6 - Placa depois da incubação.....	42
Figura 7 - Controle da <i>C. glabrata</i> nos meios de cultivo versus o crescimento da <i>C. glabrata</i> nos meios de cultivos acrescidos de MRS.....	45
Figura 8 - Efeito dose-dependente do pós-biótico de <i>L. casei</i> sobre o crescimento de leveduras de <i>C. glabrata</i>	47
Figura 9 - Efeito dose-dependente do pós-biótico de <i>L. casei</i> Shirota sobre o crescimento de leveduras de <i>C. glabrata</i>	49
Figura 10 - Efeito dose-dependente do pós-biótico de <i>L. reuteri</i> sobre o crescimento de leveduras de <i>C. glabrata</i>	51
Figura 11 - Efeito dose-dependente do pós-biótico de <i>L. rhamnosus</i> sobre o crescimento de leveduras de <i>C. glabrata</i>	53
Figura 12 - Efeito dose-dependente de NaBut sobre o crescimento de <i>C. glabrata</i>	55
Figura 13 - Controle da <i>C. neoformans</i> (H99) nos meios de cultivo versus o crescimento da <i>C. neoformans</i> nos meios de cultivos acrescidos de MRS.....	64
Figura 14 - Efeito dose-dependente do pós-biótico de <i>L. casei</i> sobre o crescimento de leveduras de <i>C. neoformans</i> (H99).....	66
Figura 15 - Efeito dose-dependente do pós-biótico de <i>L. casei</i> Shirota sobre o crescimento de leveduras de <i>C. neoformans</i> (H99).....	68
Figura 16 - Efeito dose-dependente do pós-biótico de <i>L. reuteri</i> sobre o crescimento de leveduras de <i>C. neoformans</i> (H99).....	70
Figura 17 - Efeito dose-dependente do pós-biótico de <i>L. rhamnosus</i> sobre o crescimento de leveduras de <i>C. neoformans</i> (H99).....	72
Figura 18 - Efeito dose-dependente de NaBut sobre o crescimento de <i>C. neoformans</i>	74
Figura 19 – Análise do Desvio-padrão no efeito dose-dependente do pós-biótico de <i>L. casei</i> sobre o crescimento de <i>C. glabrata</i>	88
Figura 20 – Análise do Desvio-padrão do efeito dose-dependente do pós-biótico de <i>L. casei</i> Shirota sobre o crescimento de <i>C. glabrata</i>	89
Figura 21 – Análise do Desvio-padrão do efeito dose-dependente do pós-biótico de <i>L. reuteri</i> sobre o crescimento de <i>C. Glabrata</i>	90
Figura 22 – Análise do Desvio-padrão do efeito dose-dependente do pós-biótico de <i>L. rhamnosus</i> sobre o crescimento de <i>C. glabrata</i>	91

Figura 23 – Análise do Desvio-padrão do efeito dose-dependente de NaBut sobre o crescimento de <i>C. glabrata</i>	92
Figura 24 – Análise do Desvio-padrão do efeito dose-dependente do pós-biótico de <i>L. casei</i> sobre o crescimento de <i>C. neoformans</i> (H99).....	93
Figura 25 – Análise do Desvio-padrão do efeito dose-dependente do pós-biótico de <i>L. casei</i> Shirota sobre o crescimento de <i>C. neoformans</i> (H99).....	95
Figura 26 – Análise do Desvio-padrão do efeito dose-dependente do pós-biótico de <i>L. reuteri</i> sobre o crescimento de <i>C. neoformans</i> (H99).....	97
Figura 27 - Análise do Desviopadrão do efeito dose-dependente do pós-biótico de <i>L. rhamnosus</i> sobre o crescimento de <i>C. neoformans</i> (H99).....	98
Figura 28 – Análise do Desvio-padrão do efeito dose-dependente de NaBut sobre o crescimento de <i>C. neoformans</i>	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Preparo das placas de pós-bióticos dos <i>Lactobacillus</i> spp.	39
Tabela 2 - Preparo das placas de NaBut.....	41
Tabela 3 - Resumo dos resultados dos pós-bióticos dos <i>Lactobacillus</i> spp e NaBut nos diferentes meios utilizados na redução do crescimento de <i>C. glabrata</i>	56
Tabela 4 - Resumo dos resultados dos pós-bióticos dos <i>Lactobacillus</i> spp e NaBut nos diferentes meios utilizados na redução do crescimento de <i>C. neoformans</i>	75

LISTA DE ABREVIATURAS

3-HPA - β -hidroxipropionaldeído

AIDS - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC - *American Type Culture Collection*

BrCAST - *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* ou Comitê Brasileiro de Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos

CIM - Concentração Inibitória Mínima

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

FAO – *Food and Agriculture Organization* ou Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura

FOS – Frutooligossacarídeos

FS- Faculdade de Ciências da Saúde

GOS - Glicooligossacarídeos

HAT - Histonas Acetiltransferases

HDAC - Histonas Desacetilases

HDACi - Inibidores de Histona Desacetilases

HuB - Hospital Universitário de Brasília

HIV - *Human Immunodeficiency Virus* ou Vírus da Imunodeficiência Humana

ISAPP – *International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics* ou Associação Científica Internacional de Probióticos e Prebióticos

LAC – *Lactobacillus* spp.

MALDI-TOF - *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Light* ou Espectrometria de massa de tempo de voo por ionização de dessorção a laser assistida por matriz

MM - Meio Mínimo

MRS - *Lactobacilli MRS Broth*

NaBut - Butirato de Sódio

OD - Densidade Ótica

OMS - Organização Mundial de Saúde

pH - Potencial Hidrogeniônico

RDC - Resolução da Diretoria Colegiada

RNA - Ácido Ribonucleico

Rpm - Rotação por minuto

RPMI 1640 - Meio Roswell Park Memorial Institute 1640

Sab – *Sabouraud*

SAL - Salina

SDA – *Sabouraud Dextrose Agar* ou Sabouraud Dextrose em ágar

ULEG/FS - Laboratórios de Ensino de Graduação da Faculdade de Saúde

UnB – Universidade de Brasília

UTI - Unidade de Terapia Intensiva

CVV - Candidíase vulvovaginal

YM – *Yeast Malt Broth* ou Meio Malte de Leveduras

YPD – *Yeast Peptone Dextrose* ou Extrato de levedura peptona dextrose

Sumário

1. Introdução	19
1.1. Resistência antimicrobianos (A dramática escassez de antimicrobianos)	19
1.2. <i>Candida glabrata</i> (<i>Nakaseomyces glabrata</i>)	20
1.2.1. Resistência ao Fluconazol	22
1.3. <i>Cryptococcus neoformans</i>	23
1.3.1. Resistência a antifúngicos e o mecanismo de ação desses fármacos	24
1.4. <i>Lactobacillus</i> spp. - bactérias lácticas	26
1.4.1. Probióticos	27
1.4.2. Prebióticos	27
1.4.3. Simbióticos	28
1.4.4. Pós-bióticos	28
1.4.5. Butirato de Sódio	30
2. Justificativa	32
3. Objetivo geral	33
3.1. Objetivos específicos	33
4. Materiais e Métodos	34
4.1. Origem e isolamento das Linhagens	34
4.2. Meio de Cultivos	34
4.3. Estoques e inóculos	35
4.4. Reagentes e soluções	35
4.5. Curva de crescimento - Concentração Inibitória Mínima (CIM)	36
4.6. Preparo da Placa - Concentração Inibitória Mínima (CIM)	37
4.6.1. Leitura no espectrofotômetro	37
4.6.2. Preparo das placas de pós-bióticos de <i>Lactobacillus</i> spp.	37
4.6.3. Preparo das Placas de NaBut	39
4.7. Análises Estatísticas.	42
Capítulo 1- <i>Lactobacillus</i> spp. e Butirato de Sódio versus <i>Candida glabrata</i>	43
5. Resultados	44
5.1. <i>Lactobacillus</i> spp.	44
5.2. <i>L. casei</i>	46
5.6. Butirato de Sódio (NaBut)	54
5.7. Resumo dos resultados	56
6. Discussão	57

Capítulo 2 - <i>Lactobacillus</i> spp. e Butirato de Sódio versus <i>Cryptococcus neoformans</i>	62
7. Resultados.....	63
7.1. <i>L. casei</i>	65
7.2. <i>L. casei</i> Shirota	67
7.3. <i>L. reuteri</i>	69
7.4. <i>L. rhamnosus</i>	71
7.5. Butirato de Sódio	73
7.6. Resumo dos resultados	75
8. Discussão.....	76
9. Conclusão.....	79
10. Referência	80
11. Apêndice	88

1. Introdução

Na natureza existem relações ecológicas entre os seres vivos denominadas harmônicas e desarmônicas. A competição por nutrientes e espaço é a premissa postulada por Herbert Spencer e mais tarde explorada por Charles Darwin: sobrevivência do mais apto, ou conceito relativo à competição pela predominância. Tal competição ocorre em todos os nichos ecológicos, seja em um macro-ecossistema (oceanos e florestas, por exemplo) ou micro-ecossistema (microbiota da pele, intestino) (SCHLUTER, 2001).

O intestino é um micro-ecossistema composto por células imunológicas, enzimas, nutrientes e micro-organismo a fim de manter aquele complexo ambiente em homeostase. Os seres humanos passam a vida inteira em contato com variados micro-organismos, dessa forma a microbiota intestinal abrange bactéria e fungos que foram selecionados evolutivamente com relações harmônicas e desarmônicas entre si. As bactérias lácticas como os *Lactobacillus* tem a capacidade de proliferar e sobreviver no intestino, trazendo benefícios ao hospedeiro ao competir com outros micro-organismos patogênicos e interagir com o sistema imunológico (MAZZIOTTA et al., 2023).

A resistência a antimicrobianos é um exemplo de evento evolutivo inevitável, que podem ser aceleradas por adição de fatores externos. Fungos e bactérias expostos a agentes antimicrobianos sofrem pressão seletiva no meio no qual fármacos são empregados, e quanto mais expostos, mais linhagens resistentes surgem devido às alterações genéticas que favorecem a sobrevivência e colonização (BOTTERY; PITCHFORD; FRIMAN, 2021; DAVIES; DAVIES, 2010).

1.1. Resistência antimicrobianos (A dramática escassez de antimicrobianos)

A resistência antimicrobiana é definida como a capacidade de um micro-organismo resistir aos efeitos dos antimicrobianos, podendo ser uma característica do micro-organismo ou a capacidade deste de adquirir a resistência durante o processo infeccioso (GIONO-CEREZO et al., 2020).

Diferentes mecanismos estão associados a resistência microbiana, essa resistência é considerada antiga, pois é o resultado esperado da interação entre organismos ao longo do tempo. Os micro-organismos usam estratégias genéticas como mutação ou aquisição de genes por meio de transferência horizontal de materiais genéticos, como DNA de outros micro-organismos, que codificam determinantes de resistência (MUNITA; ARIAS, 2016).

Sendo assim, o surgimento da resistência antimicrobiana em micro-organismos é um fenômeno natural, mas a seleção da resistência antimicrobiana tem sido impulsionada ou acelerada pela exposição descontrolada aos antimicrobianos, seja nas áreas da saúde humana e

animal, na agricultura e até mesmo no meio ambiente, por meio do uso de fertilizantes sintéticos e/ou pesticidas (HOLMES et al., 2016).

Com esse título inicia um documento recente da Organização Mundial de Saúde (OMS), “*No time to wait: securing the future from drug-resistant infection*”, enfatizando um alerta de saúde pública mundial acerca da gravidade da resistência microbiana. Estima-se que até 2050 este será o maior problema enfrentado no âmbito da saúde (D’ANDREA et al., 2019). Na década atual, a resistência aos antimicrobianos já é considerada como uma das três mais importantes ameaças à saúde pública (MUNITA; ARIAS, 2016).

As infecções resistentes a medicamentos causam pelo menos 700.000 mortes em todo o mundo anualmente, incluindo 230.000 mortes por tuberculose multirresistente. Em um cenário mais alarmante, se nenhuma ação for tomada, projeta-se cerca de 10 milhões de mortes por ano em todo o mundo até 2050, sendo que 2,4 milhões de pessoas poderão vir a óbito em países de alta renda entre 2015 e 2050 (IACG, 2019).

As infecções fúngicas invasivas resistentes a antifúngicos causam elevado risco a população, principalmente em indivíduos imunossuprimidos. Fungos patogênicos são responsáveis por infecções graves em mais de 300 milhões de pessoas mundialmente, resultando em 1,6 milhões de mortes anualmente (BERMAS; GEDDES-MCALISTER, 2020). Vale citar que os dados epidemiológicos, muito provavelmente, são subestimados, haja vista que doenças fúngicas são amplamente negligenciadas.

As infecções fúngicas são recorrentemente associadas às outras doenças. Um exemplo recente foi a pandemia do coronavírus, em que o aumento das infecções fúngicas está diretamente associado a COVID-19. Recentemente, a OMS publicou um guia dos principais fungos patogênicos humanos, resistentes a antimicrobianos, que carecem mais de estudos. O guia divide os fungos patogênicos em três grupos: grupo de prioridade crítica (*Cryptococcus neoformans*, que a mortalidade varia de 41% a 61%, principalmente em paciente com HIV/AIDS), grupo de alta mortalidade (*Nakaseomyces glabrata* - *Candida glabrata* - com taxa de mortalidade de 20% a 50%) e média prioridade (*Cryptococcus gattii*, por exemplo) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022).

1.2. *Candida glabrata* (*Nakaseomyces glabrata*)

Taxonômica e morfológicamente, *Candida* spp. é um gênero de fungo leveduriforme comensal, que pertence à família *Saccharomycetaceae*, responsável pela patologia denominada candidíase (RODRÍGUEZ-CERDEIRA et al., 2020). De acordo com estudos, a maioria das

espécies de *Candida* são consideradas oportunistas e dependendo das condições que se encontram, consegue mudar de comensal (forma inofensiva) para uma forma infecciosa (MUNDULA et al., 2019; QUINDOS et al., 2019).

Essas espécies oportunistas são divididas em dois grupos, o primeiro grupo com maiores incidências de infecções é chamado de complexo de *C. albicans* e o segundo grupo de menor incidência, é chamado de *Candida*-não-*albicans* (*C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, entre outras) (RODRÍGUEZ-CERDEIRA et al., 2020). Há uma nova nomenclatura para *Candida glabrata*, *Nakaseomyces glabrata*, entretanto neste estudo optou-se pela nomenclatura antiga, pois é mais difundida na literatura médica (GÓMEZ-GAVIRIA; RAMÍREZ-SOTELO; MORA-MONTES, 2022; WHO, 2022). Algumas dessas espécies são pertencentes à microbiota humana, colonizando a superfície das mucosas de diferentes tecidos, como a pele, sistema urogenital, cavidade oral, sistema respiratório e o trato gastrointestinal (MUNDULA et al., 2019).

Linhagens de *Candida* spp. patogênicas vêm aumentando em número de casos, de modo que a candidíase se tornou grave problema de saúde pública, particularmente entre mulheres em idade fértil (PANIÁGUA et al., 2021) e imunocomprometidos, devido ao alto nível de resistência aos antifúngicos (HELLSTEIN; MAREK, 2019).

Estima-se que 70% a 75% das mulheres tiveram ou terão, pelo menos uma vez, candidíase vulvovaginal (CVV) ao decorrer da vida (XIE et al., 2017). Entre 5% a 8% desenvolvem a forma recorrente, e que 8 a 10% das mulheres são suscetíveis à doença (PERICOLINI et al., 2017; SPAGGIARI et al., 2022). Dados epidemiológicos relatam que anualmente, aproximadamente 138 milhões de mulheres no mundo todo são comedidas por CVV (DENNING et al., 2018).

Dentre as espécies de *Candida* não-*albicans* que mais emergem, a espécie *C. glabrata* é considerada a segunda mais comumente isoladas em infecções no sistema sanguíneo de pacientes imunocomprometidos, e a espécie mais comum em relação à resistência de antifúngicos. Esta espécie *C. glabrata* apresenta maior plasticidade no tocante a capacidade de resistência a tratamentos antifúngicos, particularmente ao fluconazol, fármaco mundialmente empregado no tratamento de infecções por *Candida* spp., mas que a *C. glabrata* é resistente. Essa espécie de levedura apresenta variações na parede fúngica, além de um conjunto de fatores de virulência que garantem o sucesso da infecção em humanos (TIMMERMANS et al., 2018).

Pesquisas observaram que *C. glabrata* é responsável por 10% a 15% dos casos de VVC, os sintomas característicos dessa infecção é inflamação da vagina (vaginite), com inchaços,

eritemas, coceira vulvar, corrimento anormal, ardor vulvar, dor e irritação (MARTIN LOPEZ, 2015; PALADINE; DESAI, 2018).

Gênero *Candida* pode apresentar diferentes fatores de virulência, entre eles alta capacidade de adesão, polimorfismo, produção de toxinas, capacidade de produzir enzimas hidrolíticas e sendo considerado um dos mais importantes fatores a formação de biofilmes (CAVALCANTE et al., 2020).

Os biofilmes são uma estrutura microbiana, altamente organizadas, com diversas sequências de divisão celular, incorporada em uma matriz extracelular, formando uma estrutura tridimensional em superfícies biológicas ou artificiais (PRISTOV; GHANNOUM, 2019; RODRIGUES et al., 2017).

Estudos observaram que, a espécie de *Candida* mais associada na formação de biofilmes é *C. albicans*, mas *C. glabrata* demonstra um papel de destaque em cenários hospitalares por sua capacidade de formar múltiplas camadas de biofilmes compactas com carboidratos, proteínas, ergosterol na sua matriz (RODRIGUES et al., 2017; WALL et al., 2019).

1.2.1. Resistência ao Fluconazol

A função do fluconazol é atuar na via biossintética do componente lipídico (ergosterol) do fungo, pela via do citocromo P450. O fármaco inibe a enzima catalisadora 14 α -esterol-desmetilase (que é dependente do citocromo P-450), resultando em uma membrana plasmática com defeitos na estrutura e funcionamento, inibindo o transporte de nutrientes e de sinalização, entre as células da levedura (NOCUA-BÁEZ et al., 2020; RODRIGUES et al., 2017).

Pesquisas apontam que, a resistência da *C. glabrata* ao fluconazol é associada a possíveis pequenas mutações em seu gene, pela pressão contínua do fármaco e está ligada a vários mecanismos, como a indução de bombas de efluxo, codificadas pelos genes transportadores *ABC* ou *MDR*. Esses genes pertencem à superfamília dos principais facilitadores que levam à diminuição da concentração do fármaco no citoplasma da levedura. Além disso, o fármaco tem uma afinidade diminuída, incapacitando-se de se ligar na membrana das leveduras (PAIS et al., 2020; PRISTOV; GHANNOUM, 2019; RODRIGUES et al., 2017).

Em seu estudo ALVES et al. (2020) demonstra que, as leveduras de *C. glabrata* formadoras de biofilmes ainda sobrevivem sob altas concentrações de fluconazol e que a formação de biofilmes dependente da modulação feita pela fonte de carbono e pH disponíveis no organismo do hospedeiro.

1.3. *Cryptococcus neoformans*

Cryptococcus neoformans é uma levedura encapsulada, saprófita, pertencente à família *Cryptococcaceae* (KWON-CHUNG et al., 2014). É considerado um fungo oportunista responsável por infecções cutâneas e sistêmicas, nesta última forma de infecção, principalmente em pacientes imunocomprometidos, apresenta taxa de mortalidade de 15% entre pacientes com HIV/AIDS, resultando em aproximadamente 223.000 infecções e 181.100 mortes anualmente (BERMAS; GEDDES-MCALISTER, 2020).

Outros dados epidemiológicos afirmam, que mesmo com tratamentos antifúngicos convencionais, os níveis de morte por meningite criptocócica variam de 10% a 70% (BAHN et al., 2020) e aproximadamente 1.000.000 de novos casos são descobertos por ano, sendo considerados dados alarmantes e preocupantes pelas instituições governamentais (PAUL; DOERING; MOYE-ROWLEY, 2015). As infecções por *C. neoformans* estão entre as infecções fúngicas mais comuns do sistema nervoso central, causando a meningoencefalite (SAMARASINGHE; XU, 2018).

Os primeiros isolados de *C. neoformans* foram de uma infecção óssea e de sucos de frutas, o que demonstra que o *C. neoformans* pode ser encontrado em diversos lugares (ZHAO; LIN, 2021). A infecção é causada pela inalação de propágulos distribuídos no ambiente, colonizando primeiramente o sistema respiratório. Os propágulos de *C. neoformans* depois de se instalarem nos alvéolos pulmonares, podem disseminar-se na corrente sanguínea e por consequência causar infecções no sistema nervoso central. A disseminação desse patógeno está frequentemente associada a aves, além de que a disseminação se assemelha com a de fungos filamentosos (ZARAGOZA, 2019).

Este fungo é imunologicamente categorizado em sorotipos A, B, C e D, essa divisão se baseia nas variações estruturais da cápsula, um polissacarídeo denominado glucuronoxilomanano. Linhagens do tipo A e D e do híbrido AD são pertencentes ao complexo de espécies do *C. neoformans* (sorotipo A designado *C. neoformans* var. *grubii* e sorotipo D designado *C. neoformans* var. *neoformans*), sendo que as linhagens do sorotipo A pertencem a um dos três tipos moleculares (VNI, VNII e VNB) e três genótipos AFLP (AFLP1, AFLP1A e AFLP1B). As linhagens do sorotipo D correspondem aos tipos moleculares VNIV e AFLP2. O cruzamento dos dois gera o híbrido AD são atribuídos aos tipos moleculares VNIII e AFLP3. Os demais sorotipos são pertencentes ao complexo de espécies *C. gattii* (SAMARASINGHE; XU, 2018).

C. neoformans tem reprodução heterotática com células haplóides, determinado pelo locus MAT no cromossomo 4, ou seja, dependem de reprodução sexuada com um indivíduo com diferenças genéticas. O acasalamento acontece quando linhagens opostas MAT α e MAT α se fundem uma com a outra, em resposta formam uma hifa dicariótica no qual dois núcleos parentais coexistem dentro de cada célula, mas não se fundem. As hifas aumentam formando um basídio, de modo que ocorrem a cariogamia, meiose e a replicação do DNA. O DNA mitocondrial é normalmente herdado do MAT, referente de uma das linhagens, durante a reprodução bissexual. As seguintes divisões mitóticas repetidas em paralelo com a esporogênese dão origem a quatro cadeias de esporos sexuais. Esses esporos sexuais são então liberados no meio ambiente e podem infectar humanos e outros hospedeiros (BAHN et al., 2020; SAMARASINGHE; XU, 2018; ZHAO; LIN, 2021).

Esta levedura é capaz de se adaptar de forma rápida e eficaz, o que facilita a sua sobrevivência, particularmente no organismo humano. Seu principal fator de virulência é a formação de cápsulas polissacarídicas, que contribuiu com 25% da virulência (CASADEVALL et al., 2019), que pode ser induzida devido a diversas circunstâncias associadas ao hospedeiro, como a fisiologia do hospedeiro, elevação do CO₂, nível baixo de ferro e pH neutro ou alcalino (BAHN et al., 2020).

A cápsula é bastante hidratada e tem como função conferir proteção contra ação de mecanismos imunológicos, inibindo a fagocitose por macrófagos, células dendríticas e neutrófilos (CASADEVALL et al., 2019; ZARAGOZA, 2019). A cápsula também é importante na clínica médica, pois é utilizado como antígeno criptocócico no diagnóstico, sua visualização é possível com a utilização de nanquim ou tinta-da-china (CASADEVALL et al., 2019).

Outros fatores de virulência são a formação de melanina, termotolerância a 37 °C, formação de biofilmes e a secreção de várias enzimas incluindo fosfolipases, proteinases e urease que caracterizam a interação do fungo com o sistema imune do hospedeiro e as vias de resposta do mesmo (ALSPAUGH, 2015; KONG et al., 2020). Além disso, linhagens de *Cryptococcus* resistentes a fluconazol vem sendo encontradas, principalmente em regiões socioeconômicas menos desenvolvidas e pelo uso indiscriminado do fármaco (PAUL; DOERING; MOYE-ROWLEY, 2015; PENG et al., 2018).

1.3.1. Resistência a antifúngicos e o mecanismo de ação desses fármacos

O tratamento de escolha para a criptococose varia de acordo com a gravidade da infecção. Para indivíduos com HIV/AIDS o tratamento de primeira linha é a Anfotericina B e flucitosina, e o tratamento de segunda linha é fluconazol. A Anfotericina B, liga-se a membrana

celular fúngica, formando canais de porina, resultando no rompimento da célula e o vazamento citoplasmático. Anfotericina B necessita de hospitalização para sua administração, com isso países com poucos recursos, é escolhido outros métodos de tratamento, o desoxicolato de anfotericina B é considerado nefrotóxico. Outra formulação da Anfotericina é a base de lipídios e apresenta um perfil de entrega com maior eficácia, além de reduzir a toxicidade, todavia a utilização desse fármaco é limitada devido alto custo (BERMAS; GEDDES-MCALISTER, 2020; HAMILL, 2013; LEMKE; KIDERLEN; KAYSER, 2005).

A flucitosina é um composto sintético, normalmente esse antifúngico é utilizado em combinação com outro fármaco, devido a frequente surgimento de resistência do fungo. A flucitosina tem como mecanismo de ação inibir a síntese de proteínas e ao material genético. O primeiro mecanismo envolve a mudança de a 5-fluorocitosina para monofosfato, difosfato e trifosfato de 5-fluorocitosina, em seguida o trifosfato de 5-fluorocitosina liga-se no RNA fúngico no lugar do ácido uridílico, alterando a aminoacilação do RNA transportador, mudando a síntese de RNA. E o segundo mecanismo a conversão do 5-fluorocitosina para 5-fluorodesoxiuridina monofosfato, que resulta na inibição da enzima de timidilato sintase. Esse composto tem efeitos colaterais como hepatotoxicidade, complicações gastrointestinais, entre outros (BENNETT, 1977; VERMES, 2000; VIVIANI, 1995).

A resistência do *C. neoformans* aos antimicrobianos vêm de fatores da evolução natural das linhagens e o uso equivocado de antifúngicos na medicina e na agricultura. Um dos mecanismos de resistência é a hibridização do *C. neoformans*, ou seja, a hibridização facilita alterações genéticas e adaptação do fungo ao medicamento. O mecanismo de resistência da Anfotericina B é a mutação esterol $\Delta 8-7$ isomerase, uma enzima implicada na biossíntese do ergosterol (BERMAS; GEDDES-MCALISTER, 2020).

O mecanismo de resistência da flucitosina e do fluconazol não são bem elucidados, mas acredita-se que a resistência do *C. neoformans* a flucitosina está associada as mutações em enzimas e citosinas. E a resistência do fluconazol está associada a mutações no *ERG11*, um gene que codifica a enzima lanosterol 14 α -desmetilase, o alvo da atividade dos azóis. Todavia, a principal preocupação na utilização de antifúngicos é a semelhança entre as células fúngicas e as células humanas, tornando esses medicamentos tóxicos ao organismo humano (BERMAS; GEDDES-MCALISTER, 2020).

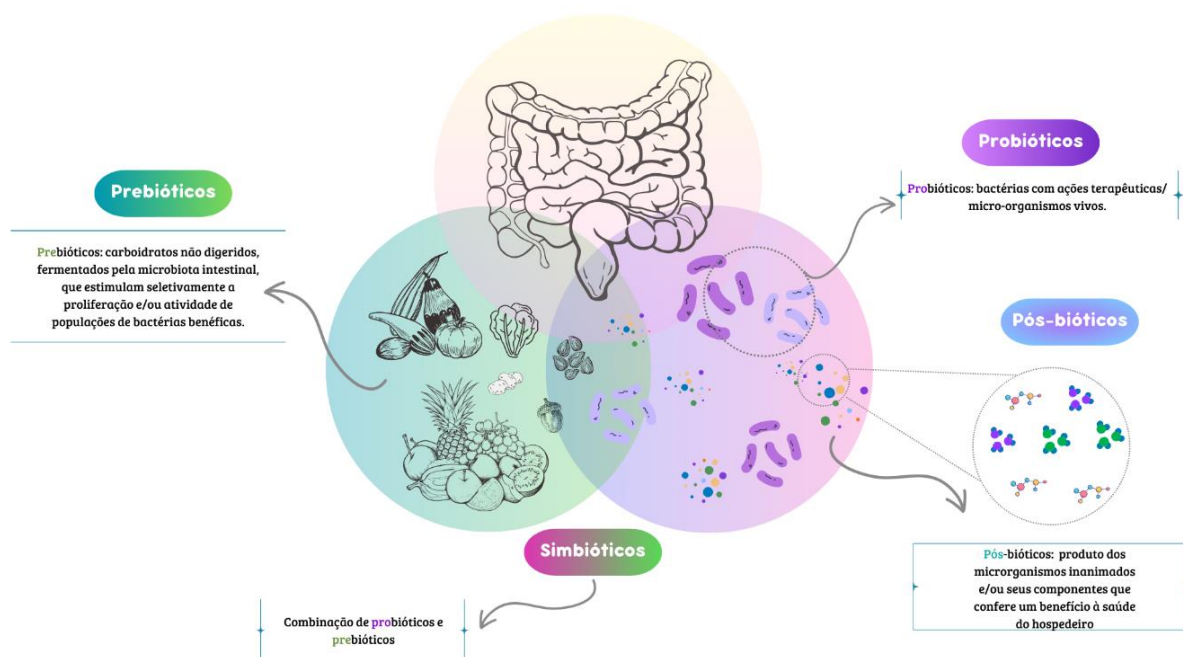
1.4. *Lactobacillus* spp. - bactérias lácticas

Lactobacillus spp. são bactérias comensais, anaeróbios facultativos, gram-positivos e não formadores de esporos (ROCHA-RAMÍREZ et al., 2017). Existem aproximadamente 60 espécies que fazem parte do grupo das bactérias lácticas, pois são capazes de converter por meio de fermentação a lactose e outros açúcares em ácido láctico (CICENIA et al., 2014).

Essas bactérias habitam o organismo humano, e vem ganhando cada vez mais atenção por causar efeitos opostos contra diversos micro-organismos patogênicos (CHEW et al., 2015). São considerados dentre os micro-organismos probióticos que mais atuam em funções essenciais de imunomodulação na mucosa intestinal, com efeitos benéficos (ZANGL et al., 2020), e também atuam restaurando e promovendo a manutenção microbiota vaginal (BUGGIO et al., 2019).

Este grupo de bactérias são responsáveis pela modulação da resposta imune do hospedeiro, sinalizando para migração de um número maior de células fagocíticas, que por sua vez liberam citocinas pró-inflamatórias (BEYER et al., 2018). Além disso, essas bactérias influenciam nas interações patógeno-hospedeiro, agem como agentes anti-adesivos e antibiofilmes de outros micro-organismos presentes no mesmo microambiente (DE GREGORIO et al., 2020), por exemplo, inibindo a formação de biofilmes pelas espécies de *Candida* (MUNDULA et al., 2019).

Figura 1 - Definições de Probióticos, Pós-bióticos e Prebióticos



Fonte: Autoria própria

1.4.1. Probióticos

Segundo a OMS, probióticos são: micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro (BUGGIO et al., 2019; DE GREGORIO et al., 2020), um exemplo de micro-organismo conveniente para os organismos humanos, são os *Lactobacillus* spp..

Os principais mecanismos de ação das bactérias probióticas são: (1) Inibir o crescimento de micro-organismo patógenos por meio de ação direta ou indireta, em uma relação desarmônica de competição contra micro-organismos invasores ou oportunistas (SEGERS; LEBEER, 2014); (2) Capacidade de melhorar a função a barreira epitelial, induzido a produção de muco, modulando as vias de sinalização (proteína quinase ativada por mitógeno) ou aumento do funcionamento das junções de oclusão que são complexos de adesão intercelular compostos por proteínas cuja função principal é regular a passagem de água e solutos entre as células epiteliais e a modulação da resposta imune (SEGERS; LEBEER, 2014); (3) Aumentando a produção de IgA na mucosa, estimulando a produção de anticorpos, ativando os receptores *Toll-like* e a diferenciação do T helper 1, além de estimular a produção de citocinas anti-inflamatórias (IL-10, TGF- β). A maioria dessas bactérias da microbiota produz ácido láctico durante a fermentação anaeróbica de sacarídeos (MARTYNIK et al., 2021).

Devido as evidências científicas que sugerem probióticos como auxiliares na manutenção da saúde, no Brasil o uso medicinal de probióticos é regulamentado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). A RDC Nº 241, DE 26 DE JULHO DE 2018, regulamenta os níveis de segurança e dos benefícios na utilização de probióticos em alimentos (ANVISA, 2018). Uma outra regulamentação foi publicada recentemente no ano de 2022, a RDC nº 718, de 01 de julho de 2022, que dispõe sobre o registro, alterações e revalidações de medicamentos probióticos e os níveis de segurança associados a esse tipo de medicamento (ANVISA; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

1.4.2. Prebióticos

Os prebióticos em 2007 foi definido pela OMS e Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura, do inglês *Food and Agriculture Organization* (FAO) como “componentes alimentar invariável que confere benefício à saúde do hospedeiro associado à modulação da microbiota”, ou seja, moléculas que ao serem metabolizadas por bactérias podem produzir metabólitos como o butirato, acetato e propionato que trazem benefícios ao hospedeiro. O conceito de prebiótico é novo e foi atualizado 2016 pela Associação Científica

Internacional de Probióticos e Prebióticos, do inglês *International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics* (ISAPP), o que modificou para “um substrato que é utilizado seletivamente por micro-organismos hospedeiros, conferindo benefícios à saúde” (FAVERO et al., 2022; QUIGLEY, 2019; YADAV et al., 2022).

Os prebióticos são ingredientes alimentares ou substratos inviáveis que ao serem ingeridos na alimentação cotidiana servem como nutrientes para bactérias probióticas e melhora a saúde humana através da modulação da microbiota (GIBSON et al., 2017). Os prebióticos não são hidrolisados no intestino e possuem valor calórico devido a não digestão no cólon. Exemplos de prebióticos são os glicooligossacarídeos (GOS), frutooligossacarídeos (FOS), lactulose derivados de galactose, β -glucanose e a inulina que são fibras dietéticas benéficas que ajudam a aumentar o volume das fezes, aliviar a constipação e aumentar a acidez fecal. A inulina é encontrada em raízes de chicória (GIBSON et al., 2017; YADAV et al., 2022).

1.4.3. Simbióticos

Os simbióticos são a combinação de prebióticos e probióticos para melhorar a saúde humana, no qual bactérias probióticas fermentam prebióticos como substrato para seu desenvolvimento. Para a ISAPP, simbióticos é definido em dois termos, o “simbiótico complementar consiste em um probiótico e um prebiótico que juntos conferem um ou mais benefícios à saúde, mas não requerem funções co-dependentes. Um simbiótico sinérgico contém um substrato que é utilizado seletivamente por micro-organismos coadministrados” (YADAV et al., 2022).

O sinergismo entre probióticos tem a função de aumentar a eficácia do prebiótico, o simbióticos estimulam o crescimento de micro-organismo benéficos, desempenham ações anti-inflamatórias (ROY; DHANESHWAR, 2023), diminui marcadores de resistência a insulina e os fatores de risco cardiovasculares, aumentam o nível de enzimas digestivas lactase, lipase, sacarase e isomaltase (YADAV et al., 2022).

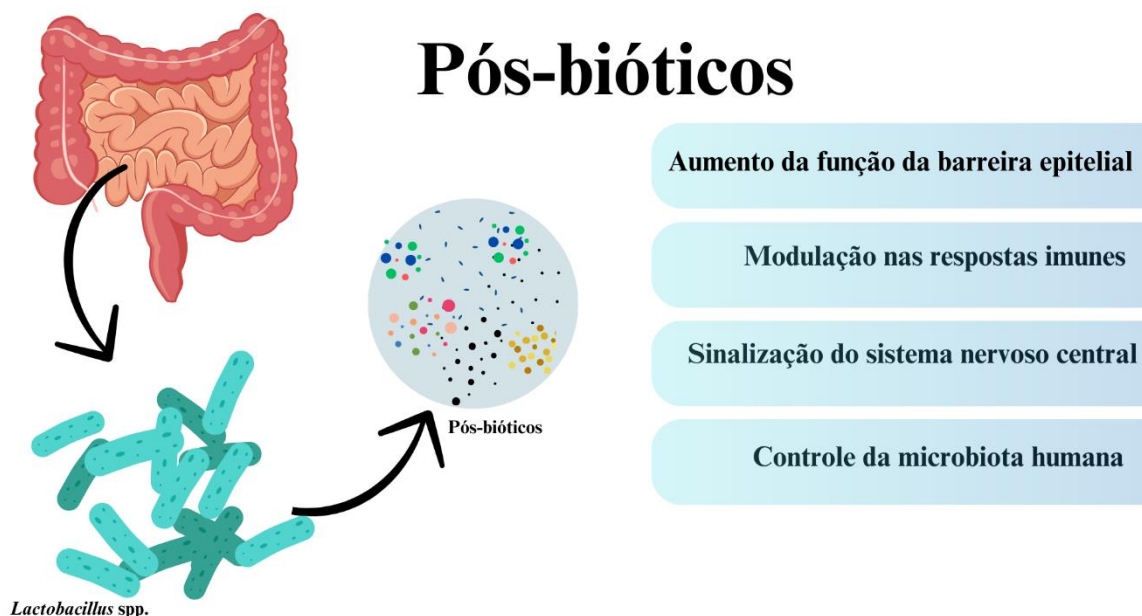
1.4.4. Pós-bióticos

Os pós-bióticos segundo a ISAPP são uma preparação de micro-organismos inanimados e/ou seus componentes que confere um benefício à saúde do hospedeiro, ou seja, substâncias ou sobrenadantes de células e/ou produtos ou subprodutos metabólicos e moléculas solúveis, liberadas por bactérias probióticas (bactérias vivas) (FAVERO et al., 2022). Esses componentes estruturais também são chamados de metabióticos, que são estruturas químicas de sinalização

que melhoram a função fisiológica do hospedeiro e tem atividades antimicrobianas (VINDEROLA et al., 2024; ZAKRZEWSKA et al., 2022).

Os pós-bióticos têm diversas vantagens em comparação aos probióticos, como um melhor perfil de segurança, por não se replicarem, não causando bacteremias e a preparação do pós-biótico pode ser armazenado por longos períodos. Contendo diversos mecanismos de ação como aumento da função da barreira epitelial, modulação nas respostas imunes e metabólicas sistêmicas e sinalização do sistema nervoso central, além do controle da microbiota humana (Figura 2) (FAVERO et al., 2022). Os pós-bióticos foram identificados em diferentes espécies de bactérias da microbiota humana como, *Bifidobacteri*, *Bacteroides fragilis*, *Escherichia coli*, *Nissle 1917* e *Faecalibacterium prausnitzii* (CICENIA et al., 2014).

Figura 2- Funções dos Pós-bióticos



Fonte: Autoria própria

Dentre as diversas bactérias probióticas, estão os *L. rhamnosus*, *L. casei* (SONG; LEE, 2017), *L. reuteri* (SILVA, 2010; SPINLER et al., 2008) e *L. casei* Shirota (PANIÁGUA et al., 2021). Essas espécies de *Lactobacillus* produzem em altas quantidades de ácido láctico, ácido acético e peróxido de hidrogênio (CECCARANI et al., 2019) mantendo o pH ácido em torno de 4,5 ou menos (BUGGIO et al., 2019).

Estudos analisaram que, a produção de ácido láctico por espécies de *Lactobacillus*, regula o pH vaginal e oral, contribuindo para manter o ambiente em homeostase e, juntamente com a produção de peróxido de hidrogênio, tem função antibiofilmes (CECCARANI et al.,

2019; MUNDULA et al., 2019). Outras substâncias produzidas são os componentes da superfície celular, ácidos graxos de cadeia curta e peptídeos bioativos (WANG et al., 2020).

Diferentes espécies de *Lactobacillus* utilizam mecanismos diversos para inibição e redução fúngica. *L. Rhamnosus*, por exemplo, utiliza a competição pelo local de adesão e o pós-bióticos do *L. rhamnosus* pode inibir a formação do tubo germinativo e da formação de biofilmes por *C. albicans*. A liberação de ácido láctico e ácidos graxos de cadeias curtas por *L. frizz* pode inibir a transformação da *C. albicans* de levedura para hifas (WANG et al., 2020). *L. reuteri* é conhecido por produzir a reuterina um composto antimicrobiano, derivado de β -hidroxipropionaldeído (3-HPA) e é produzido durante a fermentação do glicerol, sendo considerado um componente não proteico, tem ação de inibir a síntese de DNA por inibir os ribonucleotídeos redutase no início do processo da síntese de novos ribonucleotídeos. O *L. reuteri* também produz outros compostos antimicrobianos como reutericina 6, reuteriicina que é um ácido tetrâmico, o ácido láctico, entre outros metabólitos (SILVA, 2010; SPINLER et al., 2008).

1.4.5. Butirato de Sódio

O Butirato de Sódio (NaBut) é um ácido graxo de cadeia curta, produzido por bactérias fermentadoras no intestino grosso que usam como fontes fibras alimentares e amido (ex: *Clostridium butyricum* e *Faecalibacterium prausnitzii*) (JI et al., 2016; QIU et al., 2015). NaBut para alguns pesquisadores, é considerado como pós-bióticos por ser um metabólito gerado pela fermentação de bactérias probióticas (HUANG; HUANG, 2021; ŻÓŁKIEWICZ et al., 2020) e para outros autores como um produto prebiótico (BEISNER et al., 2021).

Foi publicado recentemente uma nova atualização sobre a definição de pós-biótico pela ISAPP, que a palavra pós-biótico é derivado da língua grega, sendo pós significa “depois” e a palavra biótico significa “coisas vivas”, ou seja, “depois da vida”, em razão disso, ácidos graxos de cadeia curta como o NaBut e vitaminas não tem vida, sendo classificado como prebiótico (VINDEROLA et al., 2024). Todavia, por ser algo novo, os termos e as classificações e qual grupo pertence cada substância ou metabólitos ainda está em discussão pela ISAPP e por pesquisadores em fóruns acadêmicos. O NaBut encaixa-se em ambos os termos, contudo nesse estudo o NaBut foi avaliado como um pós-biótico

Esse ácido graxo de cadeia curta tem a capacidade de modular o sistema imunológico das mucosas intestinais, visto que facilita a polarização de macrófagos, tem propriedades anti-inflamatórias regulando mediadores pró-inflamatórios TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8, função de

induzir apoptose em células cancerosas e neuromodulador no sistema nervoso central (KAŻMIERCZAK-SIEDLECKA et al., 2022; ZHOU et al., 2021).

O NaBut também atua como inibidor das histonas desacetilases (HDACi), tendo um papel na modulação epigenética de fungos (BRANDÃO et al., 2015; OLIVEIRA, 2012). Sua função como HDACi foi capaz de reduzir o crescimento e a virulência de leveduras patogênicas, como *C. albicans* (NGUYEN et al., 2011^a) e *C. neoformans* (BRANDÃO et al., 2015).

HDACi geram modificações nas histonas como acetilação, metilação e fosforilação, fazendo com que linhagens de *C. albicans* e *C. glabrata* resistentes mediante a respostas de estresses, tenham sensibilidade aos antifúngicos e diminuindo seus fatores de virulência. O gene HDA1 é um dos responsáveis na manutenção de hifas, ao inibir ou deletar a transcrição desse gene, as linhagens de *C. albicans* não conseguem desenvolver hifas (GARNAUD et al., 2016^a).

Em um estudo, foi observado a inibição fúngica e de fatores de virulência de *C. neoformans*, *C. albicans* e *C. parapsilosis* por NaBut. Observaram que o NaBut interferiu na expansão da cápsula de *C. neoformans*, o principal fator de virulência deste fungo, assim diminuiu a capacidade da levedura de evadir do sistema imunitário. Além disso, NaBut aumentou a capacidade fagocítica de macrófagos (NGUYEN et al., 2011^a). Outro estudo demonstrou que o NaBut diminuiu a formação de biofilmes de *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* resistentes a Anfotericina B, ou seja, o NaBut aumentou a capacidade de ação da Anfotericina B (AL-DHAHERI; DOUGLAS, 2010).

2. Justificativa

Abordagens terapêuticas alternativas vêm conquistando espaços e atenção no tratamento de infecções fúngicas. Há um evidente crescimento nas pesquisas que investigam o papel de probióticos e seus efeitos benéficos no tratamento de doenças fúngicas. Os probióticos destacam-se por sua capacidade em inibir ou diminuir o crescimento de determinados micro-organismos patogênicos, aumentando a barreira de defesa na microbiota intestinal. Ainda, há uma relação direta e indireta dos probióticos e pós-bióticos atuando como moduladores do sistema imunológico, como: aumento da produção de citocinas anti-inflamatórias e indução de células T reguladoras (CECCARANI et al., 2019; HU et al., 2019; MUNDULA et al., 2019).

Convenientemente, a presença desses probióticos ou de seus produtos metabólicos seria benéfica, particularmente devido à capacidade de produção de ácidos orgânicos, moléculas antimicrobianas, ou mesmo pela produção de substâncias que favorecem a existência de outros micro-organismos benéficos, reduzindo populações patogênicas. Portanto, as pesquisas que buscam propor novas abordagens terapêuticas talvez possam encontrar através da compreensão entre as relações ecológicas que ocorrem na microbiota do hospedeiro humano, uma tentativa de modular o equilíbrio de crescimento entre essas populações microbianas.

A vasta maioria dos estudos com *Lactobacillus* spp. empregam o uso do probiótico vivo. Por outro lado, o presente estudo investiga o papel de metabólitos excretados no meio por essas bactérias e do NaBut, os Pós-Bióticos, como estão sendo denominados. Trata-se de um conceito novo que ainda está em fase de discussão pelo ISAPP. A proposta deste estudo é investigar os pós-bióticos, começar a elucidar o papel dos metabólitos dos probióticos, e a depender dos achados, apontá-los como uma promissora abordagem terapêutica coadjuvante, de melhor economicidade e, especialmente, com um impacto de seleção de linhagens resistentes significativamente menores que os antimicrobianos atuais.

3. Objetivo geral

Avaliar o efeito de produtos secretados por *Lactobacillus* spp. (pós-bióticos) e do ácido graxo de cadeia curta Butirato de sódio sobre crescimento das leveduras patogênicas *Candida glabrata* e *Cryptococcus neoformans*.

3.1. Objetivos específicos

Avaliar o efeito de sobrenadante (pós-bióticos) de *Lactobacillus casei*, *L. casei* Shirota, *L. rhamnosus* e *L. reuteri* sobre o crescimento de *C. glabrata* e *C. neoformans*;

Investigar efeito do ácido graxo butirato de sódio (NaBut) sobre crescimento de *C. glabrata* e *C. neoformans*;

Determinar a Concentração Mínima Inibitória (CIM) dos pós-bióticos de *Lactobacillus* spp. sobre o crescimento *C. glabrata* e *C. neoformans*;

Determinar o CIM de NaBut sobre o crescimento de *C. glabrata* e *C. neoformans*.

4. Materiais e Métodos

4.1. Origem e isolamento das Linhagens

A linhagem de *Candida* empregada neste estudo foi *C. glabrata* American Type Culture Collection (ATCC 90030), gentilmente cedidas pelo laboratório de Microbiologia Clínica do Hospital Universitário de Brasília (HuB/UnB). A linhagem de *Cryptococcus neoformans* American Type Culture Collection (ATCC H99) foi gentilmente cedida pelo Professor Doutor Márcio Poças, do Departamento de Genética e Morfologia, do Instituto de Biologia (IB), da Universidade de Brasília (UnB).

Já as linhagens de *Lactobacillus* spp. escolhidos foram *L. casei* Shirota, isolado em 2020 no laboratório de Análises Clínicas do Departamento de Farmácia (ULEG/FS-UnB), pela Dra. Rosane Mansan a partir de Yakult (Yakult® 13, Lote H1336), as linhagens de *Lactobacillus casei* (Gamma, Lote AF43180921) *Lactobacillus reuteri* (Lemma, Lote IE2702) e *Lactobacillus rhamnosus* (Linhagem LR-G14, Lemma, Lote HK0202) foram doadas pela Prof.^a Dr.^a Yanna Nóbrega, do Laboratório Microbiologia e Imunologia Clínica (LabMIC), do Departamento de Farmácia (FAR), da Faculdade de Ciências da Saúde (FS), Universidade de Brasília (UnB)

Vale pontuar que a linhagem de *L. casei* Shirota do LabMIC foi validada por espectrometria de massa de tempo de voo por ionização de desorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF) no LACEN-DF (Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal) pela Dra. Amabel Fernandes Correia. As demais cepas de *Lactobacillus* empregadas no estudo foram adquiridas comercialmente e certificadas.

4.2. Meio de Cultivos

O meio de cultura Sabouraud Dextrose caldo (SDA) (Neogen do Brasil, São Paulo, Brasil) foi utilizado para o cultivo inicial das espécies fúngicas. Sendo o caldo composto por: hidrolisado pancreático de caseína 5%, hidrolisado péptico de tecido animal 5% e dextrose 40%.

Os meios de cultivo Meio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) (Gibco Thermo, Grand Island, Nova York, Estados Unidos) não tamponado, meio Sabouraud Dextrose caldo, meio Malte de Leveduras - YM (Neogen do Brasil, São Paulo, Brasil) (1% glicose, 0.5% peptone, 0.3% extrato de malte, 0.3% extrato de leveduras) e o meio mínimo (MM), meio quimicamente definido (15 mM dextrose, 10 mM MgSO₄, 29.3 mM KH₂PO₄, 13 mM glicina

e 3 μ M tiamina; pH5.5) foram empregados nas análises de Concentração Inibitória Mínima (CIM) para as espécies fúngicas.

Os *Lactobacillus* spp. foram cultivados em meio de cultura LACTOBACILLI MRS BROTH (MRS) Acumedia® 29 (Neogen do Brasil, São Paulo, Brasil). Sendo o caldo composto por: enzima digestiva de tecido animal 1%, extrato de carne 1%, extrato de levedura 0,5%, dextrose 2%, acetato de sódio 0,5%, polissorbato 800,1%, fosfato de dissódio 0,2%, citrato de amônio 0,234%, sulfato de magnésio 0,01% e sulfato de manganês 0,005.

4.3. Estoques e inóculos

Os estoques fúngicos e bacterianos foram mantidos a -20°C em microtubos com meio de cultura Sabouraud Dextrose e glicerol a 30% v/v.

Os pré-inóculo foram realizados a partir da retirada de 15 μ L de *C. neoformans* e *C. glabrata* dos estoques e inoculadas inicialmente em meio de cultivo Sabouraud Dextrose em ágar (SDA), para crescimento exponencial das amostras que foram testadas. O inóculo foi armazenado em estufa (Fanem, São Paulo, Brasil) a 37 ± 1 °C, sem agitação, por 24h.

O inóculo dos *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. casei* e *L. casei* Shirota foram realizados com 15 μ L de suspensão-estoque, semeados em caldo MRS e inoculados por 48h em estufa a 37 ± 1 °C, também sem agitação.

As suspensões-estoque foram armazenadas (em microtubos) novamente sob refrigeração a -20 °C e os inóculos em tubos de ensaio com tampa, foram utilizados logo após os tempos de crescimento em estufa.

4.4. Reagentes e soluções

Em relação ao preparo dos reagentes, para o Butirato de Sódio (Cayman Chemical®, Michigan, Estados Unidos da América) foram preparadas uma solução estoque, mantida a -20°C sob proteção da luz, a uma concentração de 500 mM, diluído com água para injetáveis.

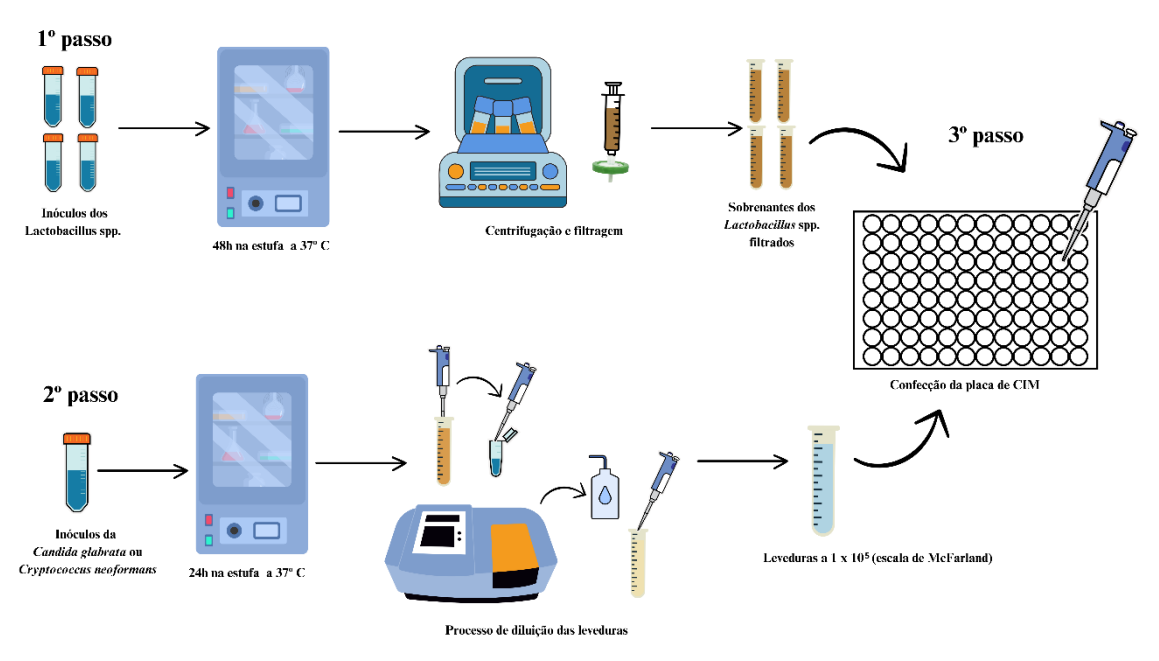
No preparo do sobrenadante da cultura de *Lactobacillus* spp. foram utilizadas culturas puras e frescas, centrifugadas por 10 minutos a 2000 rpm, utilizando centrífuga TDL80-2B Arcano® (, Novatécnica, São Paulo, Brasil) e posteriormente filtradas com filtro de membrana estéreis com poro de 0,22 μ m. Após filtração, os sobrenadantes foram estocados por até 3 dias a 5 - 8 °C.

4.5. Curva de crescimento - Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os ensaios propostos para este estudo foram baseados nos protocolos do BrCAST para ensaio de microdiluição em caldo, com algumas modificações, a saber: além do meio RPMI 1640 foram avaliados os meios Sabouraud, YM ou MM (v/v), com volume total de cada poço de 170 μ L, e a leitura de Densidade Ótica (D.O.) foi realizada a 600 nm. Cada coluna da placa de 96 poços representa um grupo (controle ou teste) e cada linha representa diluição seriada, iniciando na primeira fileira (mais concentrado) seguindo para última fileira (menos concentrado).

Para os grupos teste, foram realizadas em placa diluição seriada e os reagentes foram analisados da seguinte forma: (1) Para NaBut foram testadas as seguintes concentrações: Linha 1 [55 mM], Linha 2 [27,5 mM], Linha 3 [13,75 mM], Linha 4 [6,875 mM], Linha 5 [3,437 mM], Linha 6 [1,718 mM], Linha 7 [0,859 mM] e Linha 8 [0,429 mM]; (2) Para pós-bióticos de *Lactobacillus* foram testadas as seguintes concentrações: Linha 1 [50% v/v], Linha 2 [25% v/v], Linha 3 [12,5% v/v], Linha 4 [6,2% v/v], Linha 5 [3,1% v/v], Linha 6 [1,6% v/v], Linha 7 [0,8% v/v] e Linha 8 [0,4%v/v].

Figura 3 - Preparação do CIM



Fonte: Autoria própria

4.6. Preparo da Placa - Concentração Inibitória Mínima (CIM)

4.6.1. Leitura no espectrofotômetro

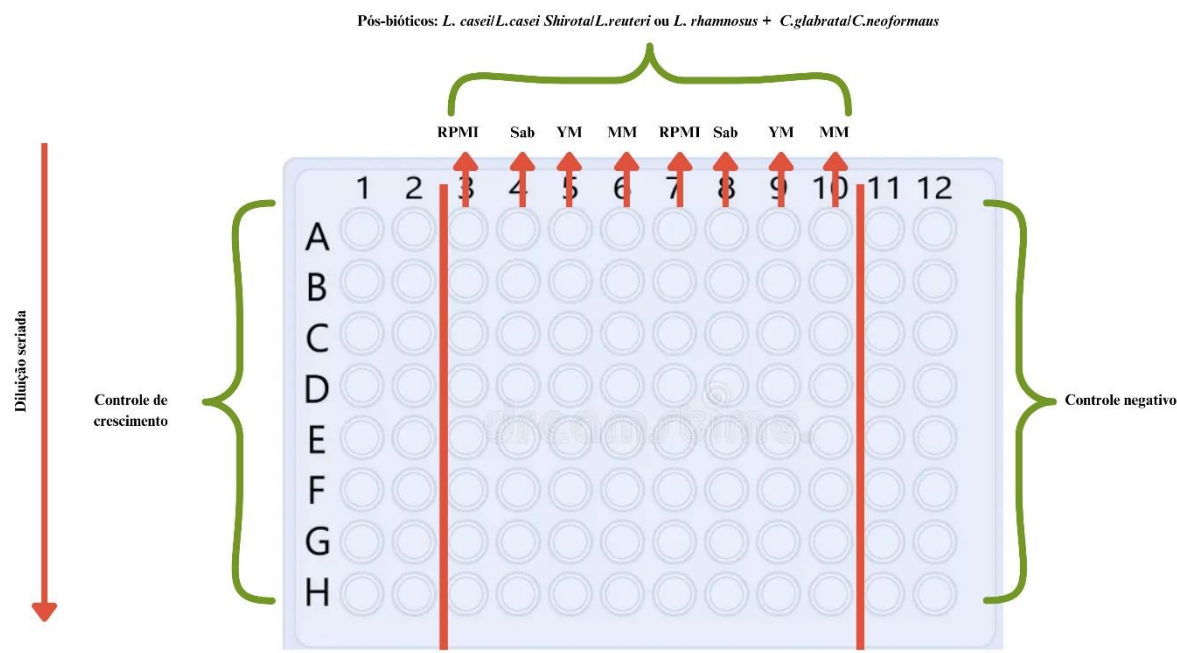
Para cada espécie fúngica avaliada, por espectrofotometria empregando Espectrofotômetro BTS 310 (BioSystems® 23, Barcelona, Espanha), foi ajustado o espectrofotômetro em comprimento de onda igual a 600 nm para leitura da Densidade Ótica (D.O.), foram adicionadas no ensaio de microdiluição. A faixa de de D.O. é entre 0,070 e 0,085, equivalente a 10^6 micro-organismos/mL após contagem dos micro-organismos. Ajustadas as D.O., foi realizada outra diluição 1:10 para a obtenção de 10^5 micro-organismos/mL.

4.6.2. Preparo das placas de pós-bióticos de *Lactobacillus* spp.

No preparo das placas de pós-bióticos de *Lactobacillus* spp. foram adicionado 150 µl de meio de cultura (RPMI, Sab, YM ou MM) em todos os poços, em seguida pipetava-se no primeiro poço 150 µl do pós-biótico do *Lactobacillus* a ser analisado, a concentração inicial de cada poço era de 50% do volume de pós-bióticos de *Lactobacillus* sp, fazia-se a diluição seriada, retirando do primeiro poço 150 µl e passando para o seguinte até o último poço ser diluído (Tabela 1). Por fim, acrescentava-se 20 µl da solução de leveduras na concentração 10^5 leveduras/mL, homogeneizava e em seguida as placas ficaram na estufa por 24h a $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

Foram feitas duas placas, uma para os *L. casei* e *L. casei* Shirota e outra para os *L. reuteri* e *L. rhamnosus*. O meio de cultivo MM foi utilizado somente para o *C. neoformans*.

Figura 4 - Desenho da Placa de pós-bióticos de *Lactobacillus*



Fonte: Autoria própria

Tabela 1 - Preparo das placas de pós-bióticos dos *Lactobacillus* spp.

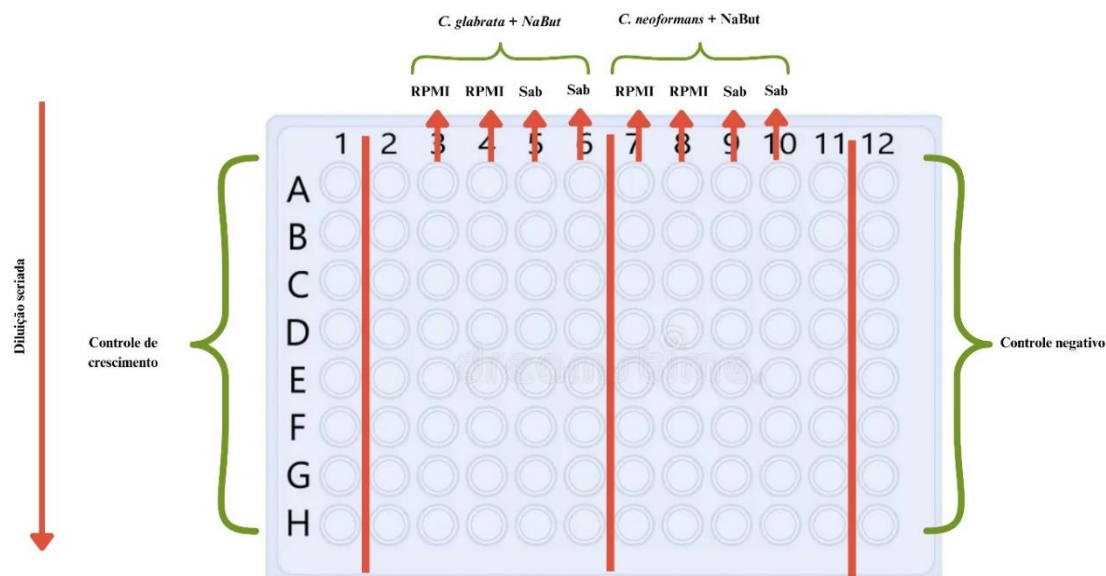
	Coluna 1: Controle de crescimento	Coluna 2: Controle de crescimento	Coluna 3: Pós- bióticos + Fungo	Coluna 4: Pós-bióticos + Fungo	Coluna 5: Pós-bióticos + Fungo	Coluna 6: Pós-bióticos + Fungo	Coluna 7: Pós-bióticos + Fungo	Coluna 8: Pós-bióticos + Fungo	Coluna 9: Pós-bióticos + Fungo	Coluna 10: Pós-bióticos + Fungo	Coluna 11: Controle Negativo	Coluna 12: Controle Negativo
Linha A	RPMI + Fungo (150 µl de meio + 20 µl fungo)	SABOURA UD (Sab) + Fungo (150 µl de meio + 20 µl fungo)	150 µl de RPMI + 150 de filtrado LAC de (diluição seriada) e no final + 20µl de fungo em cada poço.	150 µl de Sab + 150 de filtrado de LAC (diluição seriada) e no final + 20µl de fungo em cada poço.	150 µl de YM + 150 de filtrado de LAC (diluição seriada) e no final + 20µl de fungo em cada poço.	150 µl de MM + 150 de filtrado de LAC (diluição seriada) e no final + 20µl de fungo em cada poço	150 µl de RPMI + 150 de filtrado LAC de (diluição seriada) e no final + 20µl de fungo em cada poço.	150 µl de Sab + 150 de filtrado de LAC (diluição seriada) e no final + 20µl de fungo em cada poço.	150 µl de YM + 150 de filtrado de LAC (diluição seriada) e no final + 20µl de fungo em cada poço.	150 µl de MM + 150 de filtrado de LAC (diluição seriada) e no final + 20µl de fungo em cada poço	Sab	Água destilada
Linha B	RPMI + Fungo (150 µl de meio + 20 µl fungo)	Sab + Fungo (150 µl de meio + 20 µl fungo)	Diluição seriada	Diluição seriada	Diluição seriada	Diluição seriada	Diluição seriada	Diluição seriada	Diluição seriada	Diluição seriada	Sab	Água destilada
Linha C	RPMI+ Fungo+MRS (75 µl de meio+75 µl MRS+20 µl fungo)	Sab + Fungo + MRS (75 µl de meio + 75 µl MRS + 20 µl fungo)	Diluição seriada	Diluição seriada	Diluição seriada	Diluição seriada	Diluição seriada	Diluição seriada	Diluição seriada	Diluição seriada	MRS	RPMI
Linha D	RPMI+ Fungo+MRS (75 µl de meio+75 µl MRS+20 µl fungo)	Sab + Fungo + MRS (75 µl de meio + 75 µl MRS + 20 µl fungo)	Diluição seriada	Diluição seriada	Diluição seriada	Diluição seriada	Diluição seriada	Diluição seriada	Diluição seriada	Diluição seriada	MRS	RPMI
Linha E	MM + Fungo (150 µl de meio + 20 µl fungo)	YM + Fungo (150 µl de meio + 20 µl fungo)	Diluição seriada	Diluição seriada	Diluição seriada	Diluição seriada	Diluição seriada	Diluição seriada	Diluição seriada	Diluição seriada		YM
Linha F	MM + Fungo (150 µl de meio + 20 µl fungo)	YM + Fungo (150 µl de meio + 20 µl fungo)	Diluição seriada	Diluição seriada	Diluição seriada	Diluição seriada	Diluição seriada	Diluição seriada	Diluição seriada	Diluição seriada		YM
Linha G	MM+ Fungo +MRS (75 µl de meio+75 µl MRS+20 µl fungo)	YM + Fungo + MRS (75 µl de meio+75 µl MRS+20 µl fungo)	Diluição seriada	Diluição seriada	Diluição seriada	Diluição seriada	Diluição seriada	Diluição seriada	Diluição seriada	Diluição seriada		MM
Linha H	MM+ Fungo +MRS (75 µl de meio+75 µl MRS+20 µl fungo)	YM + Fungo + MRS (75 µl de meio+75 µl MRS+20 µl fungo)	Diluição seriada	Diluição seriada	Diluição seriada	Diluição seriada	Diluição seriada	Diluição seriada	Diluição seriada	Diluição seriada		MM

Legenda: Coluna 1 e 2: controle de crescimento (os meios estão na concentração de 1x nos poços sem MRS); coluna 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10: filtrado *L. casei/L.casei Shirota/L.reuteri* ou *L. rhamnosus* (LAC) e coluna 11 e 12: controle negativo (150µl de cada poço)

4.6.3. Preparo das Placas de NaBut

No primeiro poço foi adicionado 160 µl de água de injetáveis e nos demais poços (2-8 poço) pipetava-se 100 µl de água de injetáveis (ISOFARMA®, Ceará, Brasil), em seguida pipetava-se no primeiro poço 44 µl de NaBut na concentração de 2x e depois fazia-se a diluição seriada, retirando do primeiro poço 100 µl e passando para o segundo até o último poço ser diluído. Em seguida foi acrescentado mais 100 µl do meio de cultivo RPMI ou Sabouraud mais as leveduras *C. glabrata* ou *C. neoformans* na concentração 10⁵ leveduras/mL (Tabela 2) e cada placa ficou na estufa por 24h a 37 ± 1°C.

Figura 5 - Desenho da Placa de NaBut



Fonte: Autoria própria

Tabela 2 - Preparo das placas de NaBut

[illegible]

Legenda: Coluna 1: controle de crescimento (os meios + leveduras); coluna 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 10 e: realização do CIM com NaBut (*master mix* é o meio de cultivo RPMI ou Sabouraud (Sab) mais as leveduras *C. glabrata* ou *C. neoformans* e coluna 12: controle negativo

Após o período de incubação, as placas de *C. glabrata* e *C. neoformans* foram analisados por equipamento de leitura de microplaca de espectrofotometria EnSpire® *multimode plate reader* (PerkinElmer do Brazil, São Paulo, Brasil) com o comprimento de onda de 600 nm, leituras em Densidade Óptica (D.O.).

Figura 6 - Placa depois da incubação



Fonte: Autoria própria

4.7. Análises Estatísticas.

Os dados foram analisados com auxílio do programa *GraphPad Prism* (versão 8 para Windows). Os dados das curvas de crescimento foram inseridos no programa para confecção das figuras, com seus valores de densidade óptica (D.O. 600 nm) no eixo Y e valores de concentrações (dose-resposta) apresentados em ordem numérica no eixo X. As amostras foram testadas para normalidade da distribuição dos dados e as análises estatísticas serão realizadas empregando um teste para múltiplas comparações. O intervalo de confiança assumido foi 95%, com desvio padrão da amostra.

Capítulo 1

Capítulo 1- *Lactobacillus* spp. e Butirato de Sódio versus *Candida glabrata*

5. Resultados

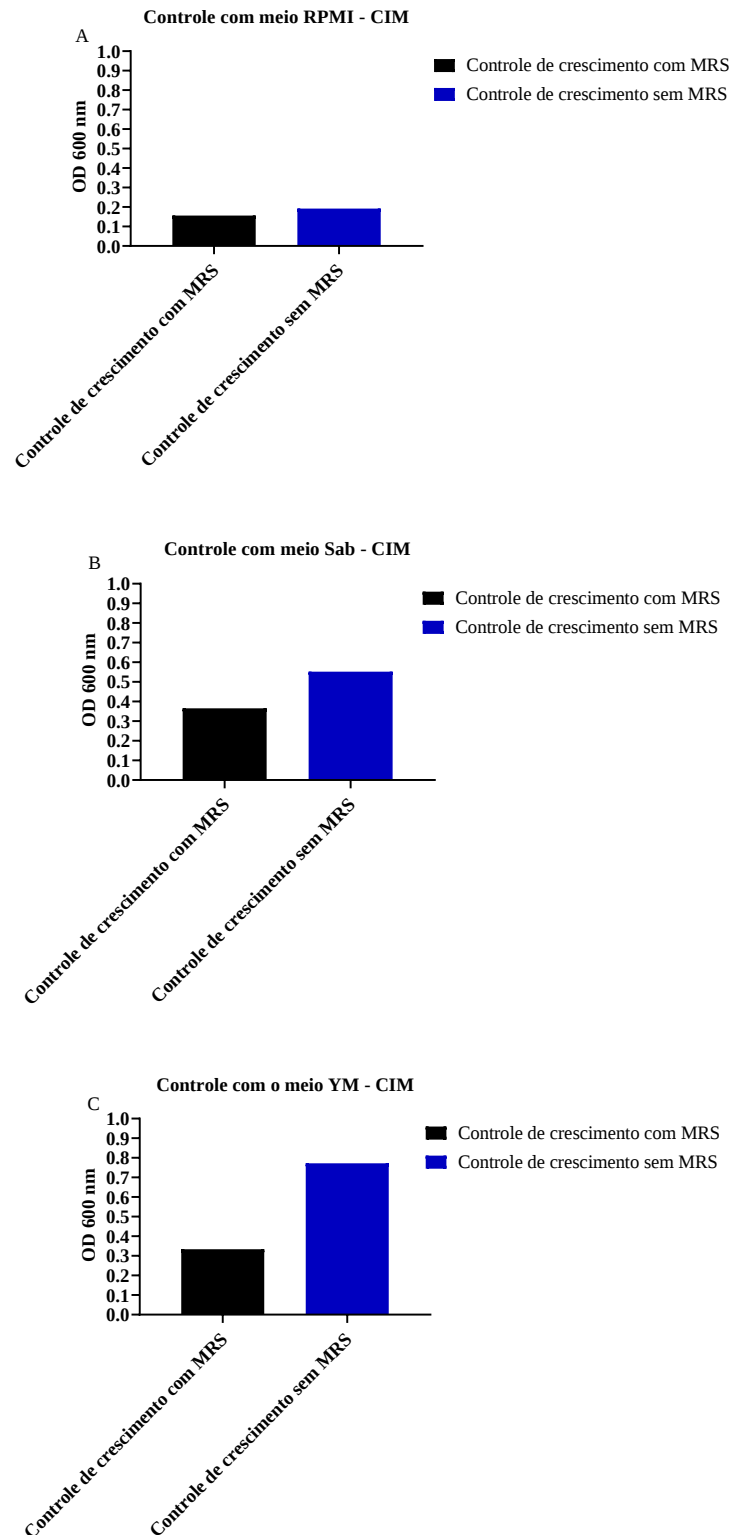
5.1. *Lactobacillus* spp.

Inicialmente, foi avaliado curvas de crescimentos da linhagem de *C. glabrata* nos meios de RPMI, Sabouraud (Sab) e YM comparados com RPMI, Sab e YM acrescido de 50% do meio, para *Lactobacillus*, MRS. Para todos os testes foi considerado como controle o meio de crescimento acrescido o volume de 50% de pós-bióticos. O racional para escolha desse modelo de controle se deu para evitar vieses de algum efeito do meio MRS sobre o crescimento da levedura, o que poderia interferir na análise real dos pós-bióticos, visto que, para estas análises é necessário adicionar o sobrenadante de culturas dos *Lactobacillus* previamente cultivados no MRS.

Observa-se na Figura 7A que *C. glabrata* no meio de cultivo RPMI não apresentou diferença em comparação ao crescimento da *C. glabrata* com os meio acrescidos de 50% de MRS. O que sugere que o MRS não interfere no crescimento da *C. glabrata* na presença do meio RPMI.

Já para os meios de cultivos YM e Sabouraud acrescidos de MRS (Figura 7B e 7C) houve redução no crescimento em comparação aos poços que tinham somente os meios de cultivos YM e Sabouraud.

Figura 7 - Controle de *C. glabrata* nos meios de cultivo versus o crescimento de *C. glabrata* nos meios de cultivos acrescidos de MRS



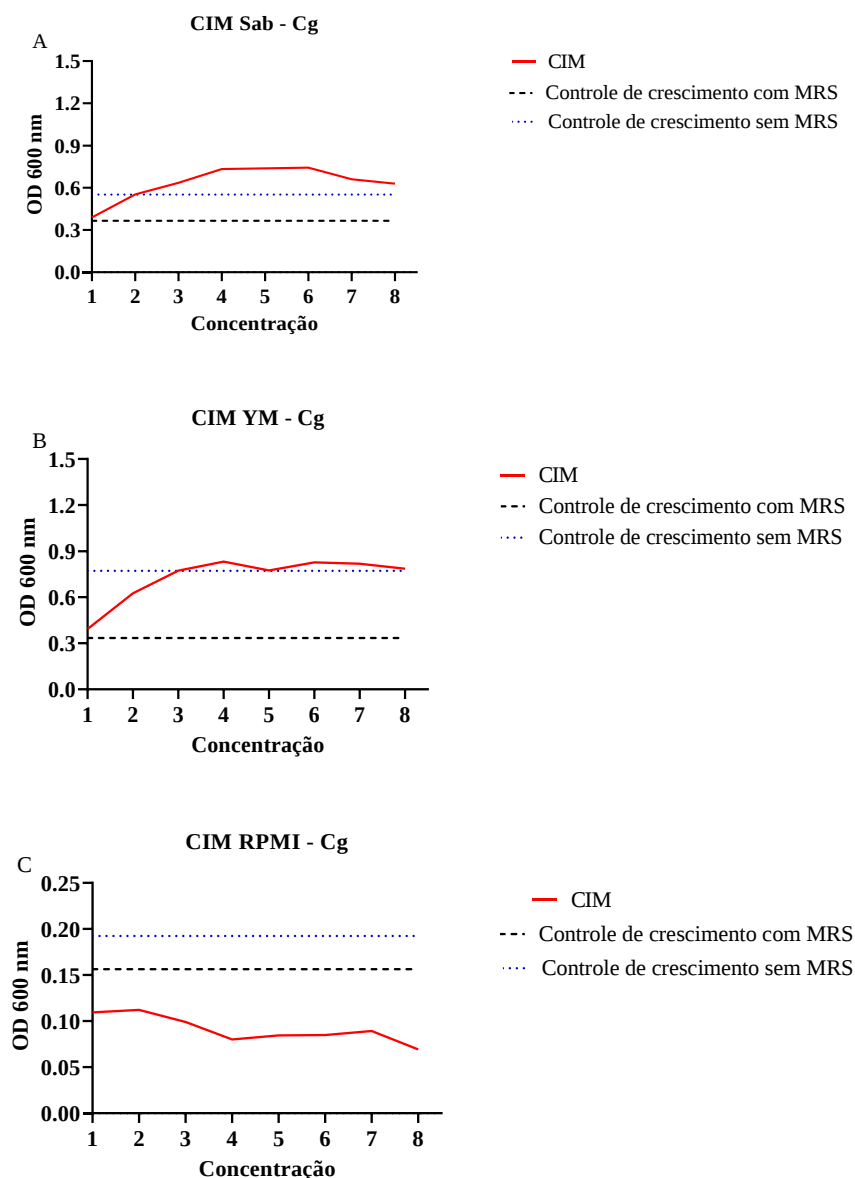
Legenda: Controle de crescimento de leveduras de *C. glabrata* com os meios de cultivos RPMI, Sabouraud (Sab) ou YM versus RPMI, Sab ou YM acrescido de MRS. A análise foi realizada no intervalo de crescimento de 24 horas. O eixo Y indica a leitura em Densidade Óptica (600 nm). No eixo X os gráficos A, B e C são os controles positivos, na cor preta há o controle de crescimento com MRS, em que há apenas *C. glabrata* mais os meios RPMI, Sab ou YM+MRS 50%, na cor azul o grupo controle de crescimento sem MRS, em que há apenas *C. glabrata* e os meios RPMI, Sab ou YM

Baseando nos dados da Figura 7, de modo a ter robustez nas análises e retirar os vieses da presença do meio MRS sobre as leveduras, para todos os ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi considerado como controle de crescimento o meio de cultivo + levedura + MRS na concentração de 50%, haja vista que foi a concentração máxima aplicada em todos os testes de pós-bióticos de *Lactobacillus* spp.. Todavia, foi mantido também a linha de crescimento que representa o crescimento do fungo somente no meio de cultivo em todos os gráficos.

5.2. *L. casei*

Nos testes de CIM aplicando o pós-biótico de *L. casei*, foram inicialmente avaliados o crescimento da levedura de *C. glabrata* nos meios complexos (YM e Sab). O pós-biótico desta espécie de LAC não inibiu o crescimento de *C. glabrata*. Ao contrário, observa-se a CIM no meio Sabouraud (Figura 8A) que *C. glabrata* na presença deste pós-bióticos cresce acima do controle com MRS, superando até mesmo a linha de crescimento da levedura crescendo sem o MRS no meio, o que é observado também no meio YM, mas somente a partir do poço 3 (Figura 8B). No RPMI (Figura 8C) o pós-biótico de *L. casei* tem o efeito de redução do crescimento da *C. glabrata* em todas as concentrações testadas.

Figura 8 - Efeito dose-dependente do pós-biótico de *L. casei* sobre o crescimento de leveduras de *C. glabrata*



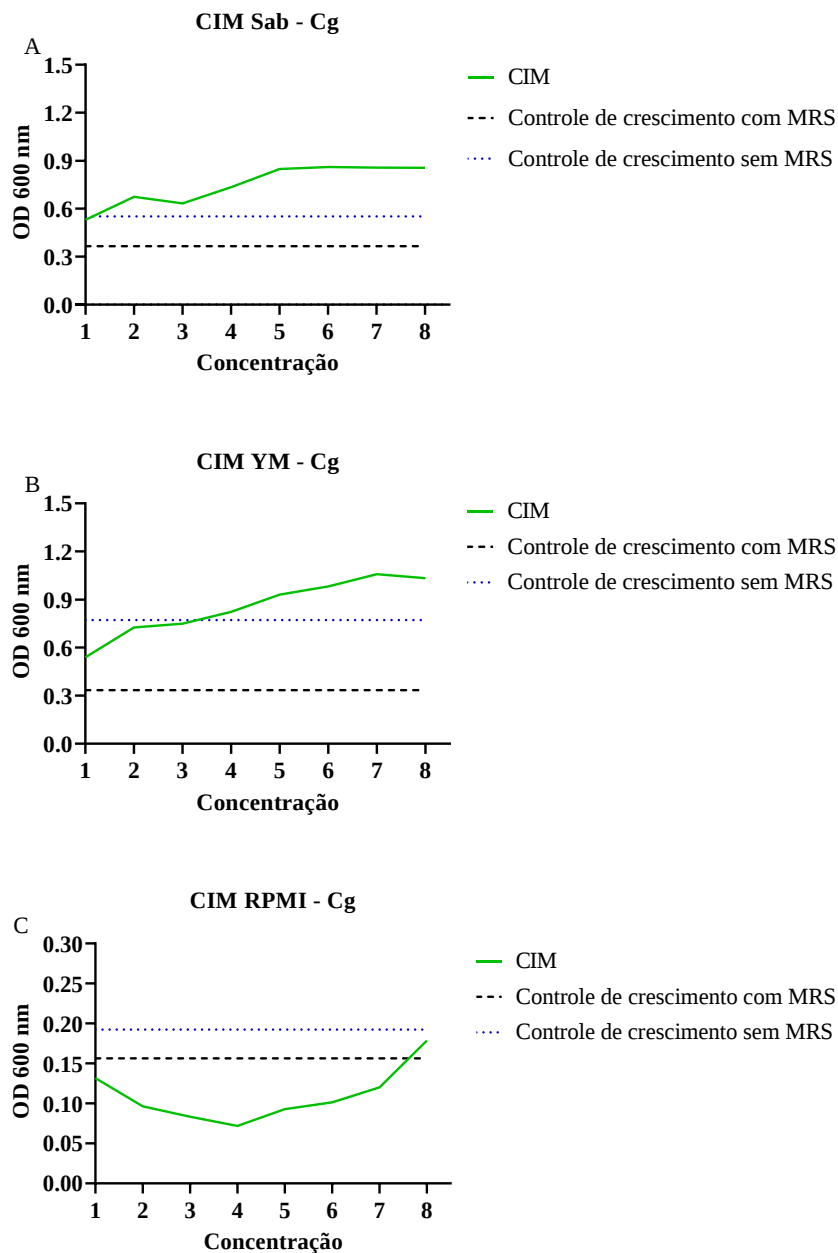
Legenda: A análise foi realizada no intervalo de crescimento de 24 horas. O eixo Y indica a densidade óptica (600 nm), o eixo X indica a concentrações seriadas dos compostos analisados (1 = [50%]; 2 = [25%]; 3 = [12.5%]; 4 = [6.25%]; 5 = [3.12%]; 6 = [1.56%]; 7 = [0.78%]; 8 = 0.39%). Na linha preta traçada há o controle de crescimento que contém o meio de cultivo (RPMI, Sab ou YM) acrescido do MRS e *C. glabrata*. Na linha azul pontilhada há o controle de crescimento em que há apenas o meio de cultivo (RPM, Sab ou YM) sem a presença do MRS. Na linha vermelha há a análise de *C. glabrata* e concentrações seriadas do pós-biótico de *L. casei*. A numeração (1-8) no eixo X indica o sentido de concentração dos compostos testados, esses valores representam diluição seriada dos compostos analisados (da maior a menor concentração). As figuras são a representação de triplicata biológica com dados similares

5.3. *L. casei* Shirota

Observa-se que o comportamento da *C. glabrata* nos meios YM, Sabouraud (Figura 9A e 9B) na presença do pós-bióticos de *L. casei* Shirota, teve o mesmo efeito que pós-biótico de

L. casei nos mesmos meios. No meio RPMI o pós-biótico reduziu o crescimento da *C. glabrata* na concentração de 50% - 0.78% (v/v). Percebe-se que a *C. glabrata* no meio RPMI que quanto menor a concentração do pós-biótico do *L. casei* Shirota, a *C. glabrata* vai aumentando o crescimento e se igualando ao crescimento do controle de crescimento sem MRS (Figura 9C).

Figura 9 - Efeito dose-dependente do Pós-biótico de *L. casei* Shirota sobre o crescimento de leveduras de *C. glabrata*



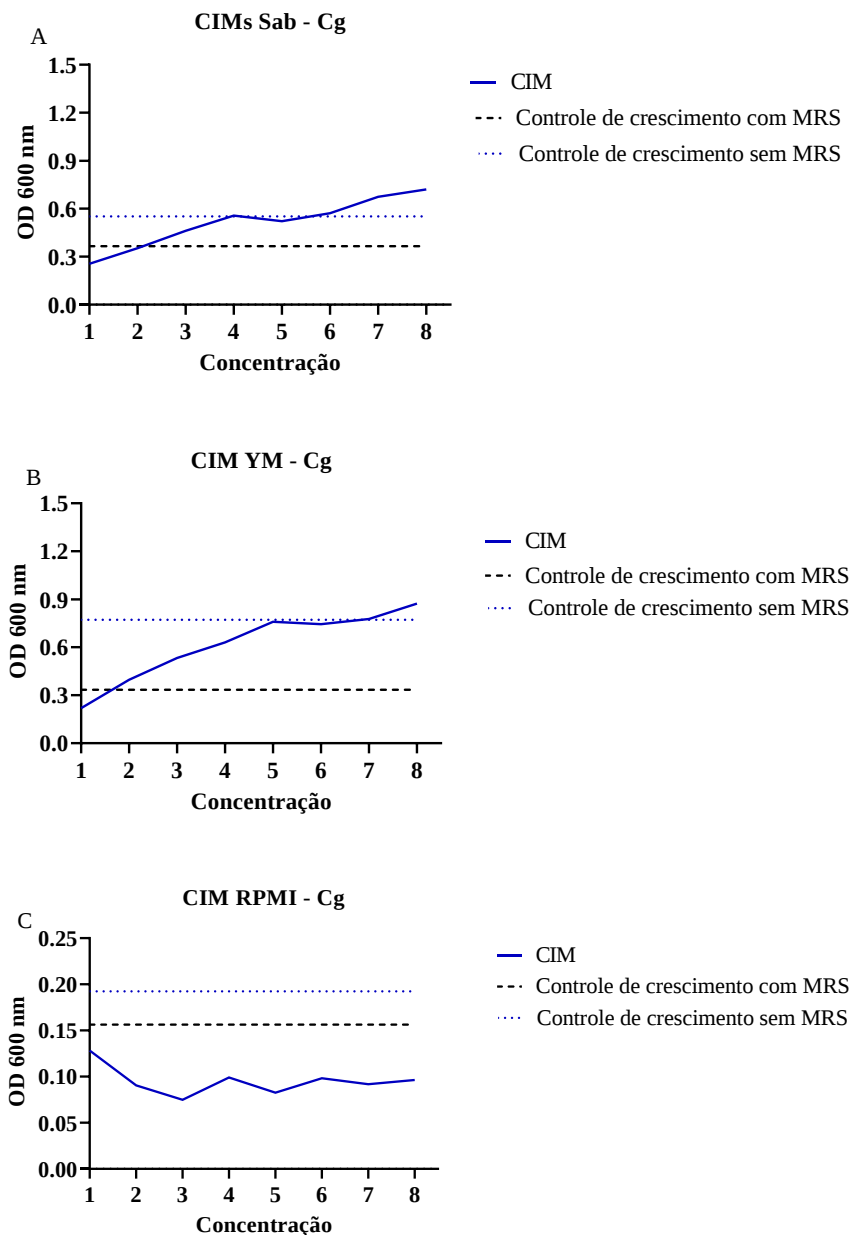
Legenda: A análise foi realizada no intervalo de crescimento de 24 horas. O eixo Y indica a densidade óptica (600 nm), o eixo X indica a concentrações seriadas dos compostos analisados (1 = [50%]; 2 = [25%]; 3 = [12.5%]; 4 = [6.25%]; 5 = [3.12%]; 6 = [1.56%]; 7 = [0.78%]; 8 = 0.39%]. Na linha preta traçada há o controle de crescimento que contém o meio de cultivo (RPMI, MM, Sab ou YM) acrescido do MRS e *C. glabrata*. Na linha azul pontilhada há o controle de crescimento em que há apenas o meio de cultivo (RPM, Sab ou YM) sem a presença do MRS. Na linha verde há a análise de *C. glabrata* e concentrações seriadas do pós-biótico de *L. casei* Shirota. A numeração (1-8) no eixo X indica o sentido de concentração dos compostos testados, esses valores representam diluição seriada dos compostos analisados (da maior a menor concentração). As figuras são a representação de triplicata biológica com dados similares

5.4. *L. reuteri*

Observa-se que o efeito do pós-biótico de *L. reuteri* reduziu o crescimento da *C. glabrata* na primeira concentração de 50 % (v/v) nos meios de cultivo Sabouraud e YM (Figura

10A e 10B), no meio RPMI (Figura 10C) houve a redução do crescimento em todas as concentrações 50% - 0.39% (v/v) do pós-biótico do *L. reuteri*, os resultados reforçam os outros dados referentes aos *L. casei* e *L. casei* Shirota. Entretanto a redução do crescimento da *C. glabrata* é dependente do pós-biótico de espécies diferentes do *Lactobacillus* e do meio de cultivo utilizado.

Figura 10 - Efeito dose-dependente do pós-biótico de *L. reuteri* sobre o crescimento de leveduras de *C. glabrata*



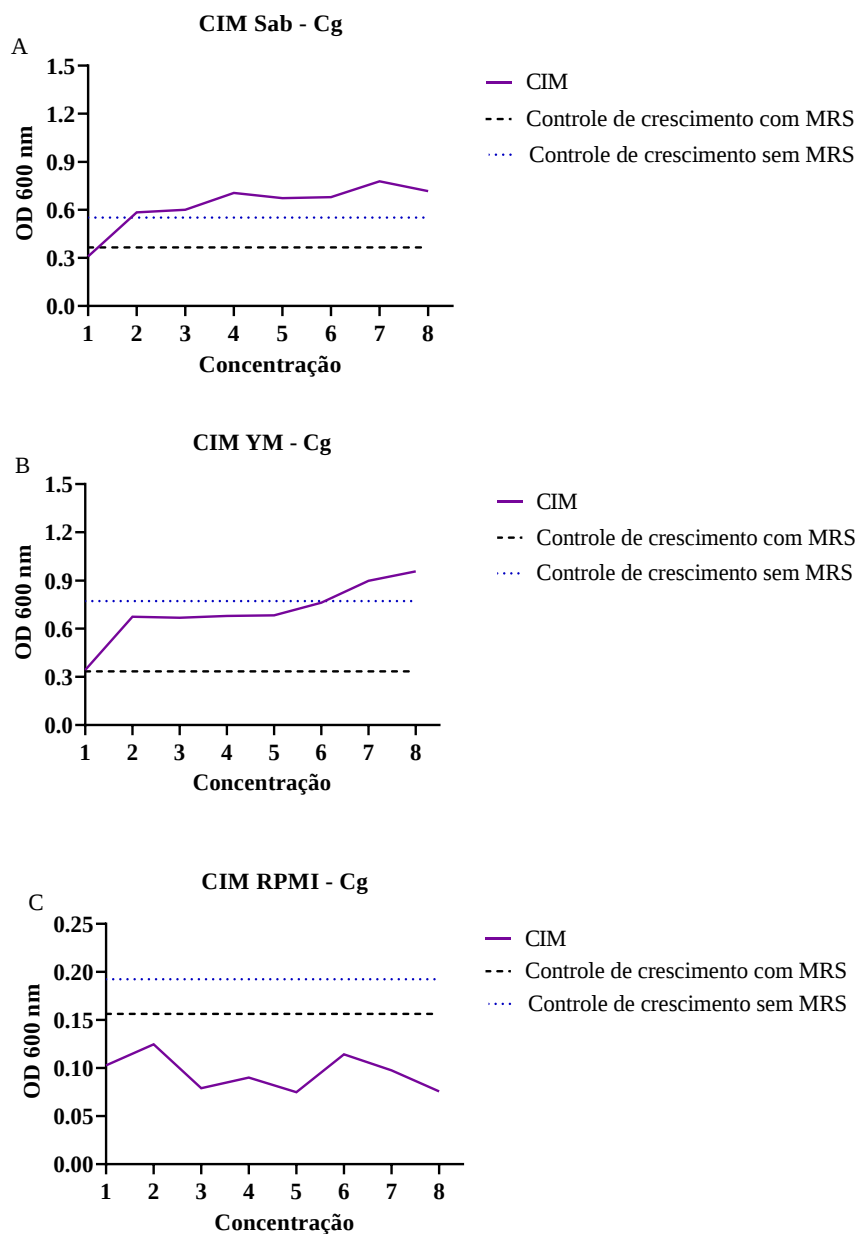
Legenda: A análise foi realizada no intervalo de crescimento de 24 horas. O eixo Y indica a densidade óptica (600 nm), o eixo X indica a concentrações seriadas dos compostos analisados (1 = [50%]; 2 = [25%]; 3 = [12.5%]; 4 = [6.25%]; 5 = [3.12%]; 6 = [1.56%]; 7 = [0.78%]; 8 = [0.39%]. Na linha preta traçada há o controle de crescimento que contém o meio de cultivo (RPMI, MM, Sab ou YM) acrescido do MRS e *C. glabrata*. Na linha azul pontilhada há o controle de crescimento em que há apenas o meio de cultivo (RPM, Sab ou YM) sem a presença do MRS. Na linha azul-escuro há a análise de *C. glabrata* e concentrações seriadas do pós-biótico de *L. reuteri*. A numeração (1-8) no eixo X indica o sentido de concentração dos compostos testados, esses valores representam diluição seriada dos compostos analisados (da maior a menor concentração). As figuras são a representação de triplicata biológica com dados similares

5.5. *L. rhamnosus*

Observa-se o mesmo efeito do pós-biótico de *L. rhamnosus* nos meios de cultivo Sabouraud e YM (Figura 11A, 11B e 11C) com os efeitos dos pós-bióticos de *L. casei* (Figura

8A, 8B e 8C) e *L. casei* Shirota (Figura 9A, 9B e 9C) nos meios de cultivo YM e Sabouraud e no meio RPMI, observa-se o mesmo efeito nos pós-bióticos dos quatro *Lactobacillus* estudados.

Figura 11- Efeito dose-dependente do pós-biótico de *L. rhamnosus* sobre o crescimento de leveduras de *C. glabrata*

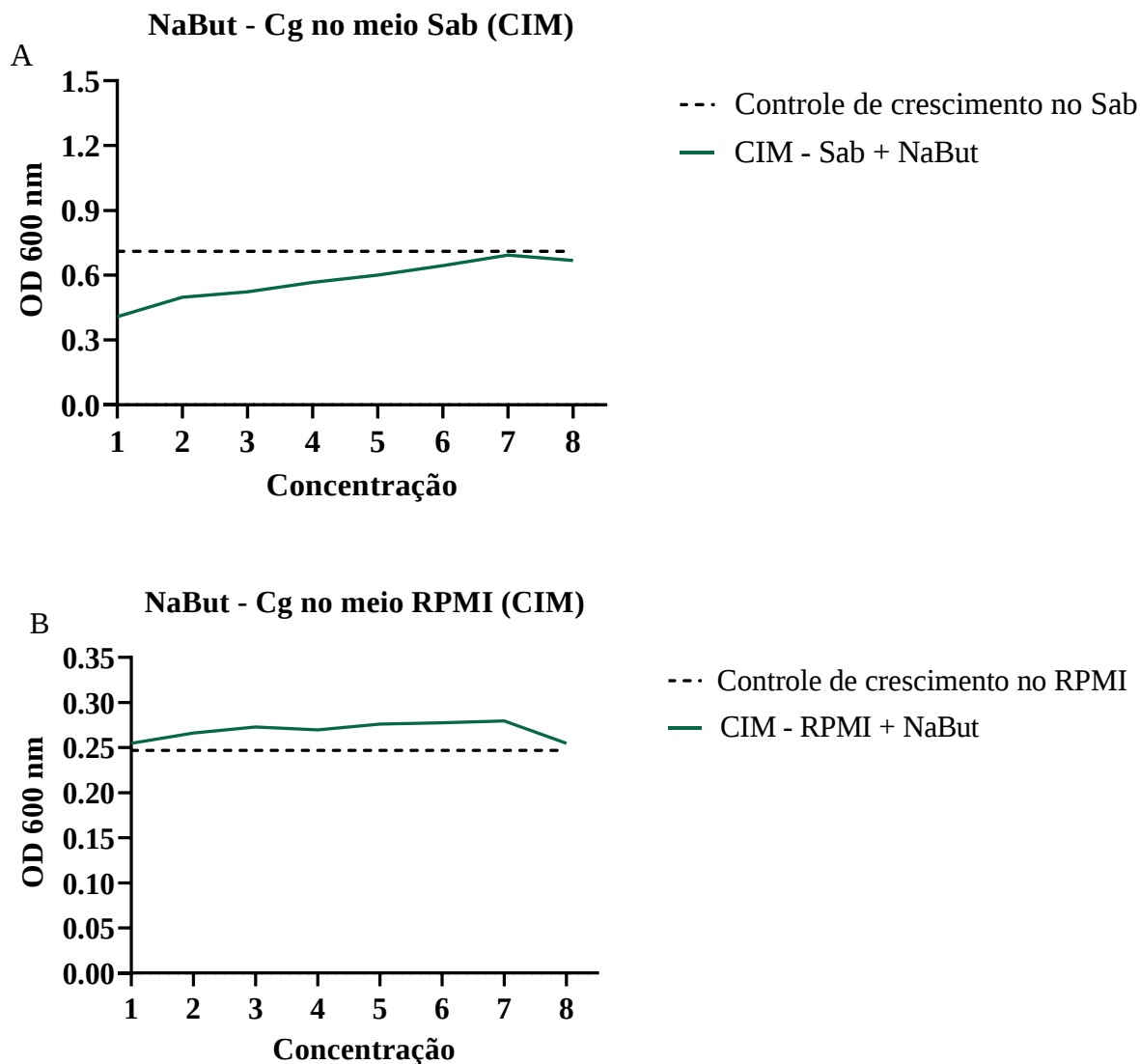


Legenda: A análise foi realizada no intervalo de crescimento de 24 horas. O eixo Y indica a densidade óptica (600 nm), o eixo X indica a concentrações seriadas dos compostos analisados (1 = [50%]; 2 = [25%]; 3 = [12.5%]; 4 = [6.25%]; 5 = [3.12%]; 6 = [1.56%]; 7 = [0.78%]; 8 = 0.39%]. Na linha preta traçada há o controle de crescimento que contém o meio de cultivo (RPMI, MM, Sab ou YM) acrescido do MRS e *C. glabrata*. Na linha azul pontilhada há o controle de crescimento em que há apenas o meio de cultivo (RPM, Sab ou YM) sem a presença do MRS. Na linha roxa há a análise de *C. glabrata* e concentrações seriadas do pós-biótico de *L. rhamnosus*. A numeração (1-8) no eixo X indica o sentido de concentração dos compostos testados, esses valores representam diluição seriada dos compostos analisados (da maior a menor concentração). As Figuras são a representação de triplicata biológica com dados similares

5.6. Butirato de Sódio (NaBut)

É possível observar na Figura 12 que o NaBut afetou negativamente o crescimento da *C. glabrata*. Houve diminuição do crescimento fúngico nas concentrações de molaridade testadas [55 mM – 1,718 mM], quando utilizado o meio de cultura Sabouraud (Figura 12A). No entanto, quando utilizado meio de cultura RPMI (Figura 12B), não houve redução no crescimento e sim um aumento do crescimento do fungo na presença do NaBut. Nota-se que o resultado do efeito do NaBut sobre crescimento e inibição da *C. glabrata* está associado ao meio de cultura utilizado, no qual, o meio mais rico em açúcar demonstra um maior efeito desarmônico no crescimento fúngico na presença do NaBut.

Figura 12 - Efeito dose-dependente de NaBut sobre o crescimento de *C. glabrata*



Legenda: A análise foi realizada no intervalo de crescimento de 24 horas. O eixo Y representa a densidade óptica (OD 600 nm), o eixo X (1-8) representa as concentrações seriadas de NaBut (1 = [55 mM], 2 = [27,5 mM], 3 = [13,75 mM], 4 = [6,875 mM], 5 = [3,437 mM], 6 = [1,718 mM], 7 = [0,859 mM] e 8 = [0,429 mM]), do mais concentrado para o menos concentrado. A linha preta traçada indica o controle de crescimento, em que apenas a *C. glabrata* e os meios de cultura, RPMI ou Sabouraud (Sab). Na linha verde-escura o grupo tratado com concentrações seriadas do NaBut. As figuras são a representação de duplicata biológica com dados similares

5.7. Resumo dos resultados

Para melhor visualização dos dados obtidos a Tabela 3 apresenta um compilado de todos os resultados obtidos.

Tabela 3 - Resumo dos resultados dos pós-bióticos dos *Lactobacillus* spp. e NaBut nos diferentes meios utilizados na redução do crescimento de *C. glabrata*

<i>C. glabrata</i>	<i>L. casei</i> (v/v)	<i>L. casei</i> Shirota (v/v)	<i>L. reuteri</i> (v/v)	<i>L. rhamnosus</i> (v/v)	NaBut (mM)
Sab	Não reduziu o crescimento	Não reduziu o crescimento	Reduziu o crescimento na concentração de 50%	Não reduziu o crescimento	Reduziu o crescimento na concentração de 55 mM - 1,718 mM
YM	Não reduziu o crescimento	Não reduziu o crescimento	Reduziu o crescimento na concentração de 50%	Não reduziu o crescimento	X
RPMI	Reduziu o crescimento em todas as concentrações testadas	Reduziu o crescimento em todas as concentrações de 50% - 0.78%	Reduziu o crescimento em todas as concentrações testadas	Reduziu o crescimento em todas as concentrações testadas	Não reduziu o crescimento

6. Discussão

Os *Lactobacillus* spp. são conhecidos como probióticos benéficos aos seres humanos e algumas linhagens apresentam atividades antifúngicas e regulação do sistema imunitário (SONG; LEE, 2017; VILLENA et al., 2011). Estudos demonstram que os *Lactobacillus* spp. no meio de cultivo liberam na sua fermentação componentes de pós-bióticos. Esses pós-bióticos podem ter ações antifúngicas, o ácido láctico, por exemplo, atravessa a membrana do fungo causando a perda da viabilidade ao reduzir o pH citoplasmático e os peptídeos podem romper a membrana dos fungos causando lesão celular, além de inativar as moléculas no citoplasma (CATANOZE et al., 2022; GERBALDO et al., 2012; VAN DER WEERDEN; BLEACKLEY; ANDERSON, 2013). Neste contexto, o presente trabalho teve o interesse de avaliar o efeito do sobrenadante de cultura (pós-bióticos) de determinadas espécies de *Lactobacillus* spp. sobre o crescimento de *C. glabrata*.

Interessantemente, nota-se que, em determinados meios e diferentes pós-bióticos de espécie-específica de *Lactobacillus* spp. ao invés de inibir o crescimento, como era esperado, aumentou. Assim, vale destacar que não são todas espécies de LAC que seriam ideais para estratégia de descolonização de *C. glabrata*, levantando a hipótese de que nem todos os *Lactobacillus* sp. atuam como inibidor ou competidor contra patógenos. Este dado indica que o efeito dos LAC provavelmente é espécie-específico, e mais, a depender da espécie de LAC utilizada em determinado contexto, poderá favorecer o crescimento do patógeno, em uma relação ecológica harmônica, que desfavorece ao hospedeiro infectado.

Foi observado em um estudo que a *C. glabrata* cresce com mais facilidade na presença de açúcares (JIANG et al., 2015), pressupunha-se que os pós-bióticos dos *Lactobacillus* não tiveram um efeito mais eficaz na redução do crescimento da *C. glabrata* quando utilizado os meios mais rico em açúcares (YM e Sabouraud) devido à facilidade da *C. glabrata* em crescer nesses meios.

O RPMI é o meio indicado para realização de CIM, segundo o BrCAST, pois tem uma precisão maior no ponto final. Os pós-bióticos dos 4 *Lactobacillus* analisados reduziram o crescimento de *C. glabrata*, corroborado com os estudos já publicados. A hipótese levantada é que dependendo do meio de cultivo e da sua composição, o pós-biótico têm efeitos divergentes, que podem estar relacionados ao pH, vitaminas, ácidos graxos e outros componentes presentes no meio, que podem interagir com o pós-biótico negativamente, ou por serem meios ricos em nutrientes, promovem melhora do crescimento fúngico para além do efeito do pós-biótico.

Diferentes estudos demonstraram que o *L. casei* inibiu o crescimento e a formação de hifas em biofilmes de *C. albicans*, um dos principais fatores de virulência, além da redução no

nível de infecção do fungo (CATANOZE et al., 2022; MANZOOR et al., 2016; SONG; LEE, 2017; VAN DER WEERDEN; BLEACKLEY; ANDERSON, 2013).

Já o estudo de VILLENA et al. (2011) observou que *L. casei* regula a função fagocítica dos macrófagos, fazendo com que os macrófagos e células dendríticas induzam a produção de TNF- α e IFN- γ no intestino de camundongos desnutridos. Outro estudo observou que utilizado o método difusão em poços na placa de Petri, o *L. casei* não teve efeito de inibição em *C. albicans* (ZAVISIC et al., 2012).

No estudo de SONG; LEE, (2017) foi avaliado o efeito de ácido láctico e peptídeos antimicrobianos, presentes no pós-bióticos de *L. casei*. Para o ácido láctico quando o pH estava próximo a 3, os pesquisadores observaram uma sutil redução sobre o crescimento de *C. albicans*. Em relação aos peptídeos antimicrobianos, a proteinase K não demonstrou efeito sobre o crescimento, já para as demais proteinases observou-se o efeito de inibição (SONG; LEE, 2017).

Produtos que contem bactérias probióticas estão sendo estudados pelos seus benefícios a saúde, principalmente em doenças gastrointestinais e doenças infecciosas. O *L. casei* Shirota, por exemplo, está presente no leite fermentado Yakult (SUTULA et al., 2013). O estudo de PANIÁGUA et al. (2021), demonstra que o efeito do probiótico do *L. casei* Shirota na inibição no crescimento e formação de biofilmes em *Candida* spp., pode estar relacionada a produção de ácido láctico pelo *L. casei* Shirota. Este estudo utilizou a mesma metodologia e meio de cultivo RPMI 1640 que foi utilizado neste estudo (PANIÁGUA et al., 2021). Outro estudo demonstrou que o *L. casei* Shirota, reduziu a quantidade 46% de *Candida* na cavidade oral, além disso eles observaram que houve uma redução nos níveis de IgA anti-*Candida*, devido à menor estimulação antigênica significando a diminuição de linhagens de *Candida* na cavidade oral (SANTOS et al., 2009).

SPAGGIARI et al. (2022), em seu estudo avaliou o efeito dos sobrenadantes de culturas de *Lactobacillus* em fatores de virulência de *C. parapsilosis* (formação de pseudo-hifas e capacidade de adesão à monocamada de células vaginais). Os produtos metabólicos produzidos por *L. reuteri* inibiram o crescimento da *C. parapsilosis*, além de afetar a viabilidade das células fúngicas, os resultados mostraram que o pós-biótico não modificou a estrutura da *C. parapsilosis* ao formar pseudo-hifas, mas diminuíram a capacidade de adesão (SPAGGIARI et al., 2022). Outro estudo demonstrou que o *L. reuteri* quando utilizado como suplementação é tão eficaz quanto nistatina em bebês prematuros para prevenção de candidíase mucocutânea (ONCEL et al., 2015).

ZHAO et al. (2016) observou que diferentes linhagens de *L. reuteri* tem efeitos antifúngicos em *C. albicans* e *C. parapsilosis*, inibindo o seu crescimento. Entretanto, em *C. krusei* não teve o seu crescimento inibido, isso deve ao fato de que essa espécie de *Candida* é menos suscetível aos pós-bióticos e ter uma maior resistência aos antifúngicos em comparação a outras espécies de *Candida* (ZHAO et al., 2016).

O *L. rhamnosus* produz ácido láctico e peptídeos antimicrobianos que tem função de inibir efeito de virulência de *Candida* (MANZOOR et al., 2016; SONG; LEE, 2017). Um estudo demonstrou que *L. rhamnosus* tem ação antifúngica em *C. albicans* ao reduziu a formação de biofilmes em prótese dentárias, utilizando o método por difusão em disco Kirby-Bauer. Foi observado também que a *C. albicans* pode ser sensível a peptídeos antifúngicos liberados por *L. rhamnosus* e *L. casei* (SONG; LEE, 2017).

Foi observado atividade antifúngica de linhagens de *L. rhamnosus* contra *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, utilizando o método de sobreposição (PITHVA et al., 2014). Outro estudo demonstra que o sobrenadante dos *L. rhamnosus* diminuiu a quantidade de *Candida* no intestino de camundongos. Os resultados demonstraram que a infecção por *Candida* aumenta a produção de citocinas, mas quando administrado o *L. rhamnosus* houve uma diminuição de citocinas, mostrando a regulação do sistema imunitário (PANPETCH et al., 2020).

STIVALA et al. (2021) observou-se que o *L. rhamnosus* tem atividade antimicrobiana contra linhagens de *C. albicans* e *C. glabrata*, no qual foi testado diversos fatores para saber se a linhagens de *L. rhamnosus* é probiótico viável, resultando que o *L. rhamnosus* é uma linhagem com potencial probiótico, por produzir pós-bióticos com ação contra biofilme de fungos e bactérias, redução da capacidade de aderir à mucosa epitelial, e diminuição na capacidade de formar agregados fortes e co- agregados com *Candida* (STIVALA et al., 2021). Outro estudo observou que *L. rhamnosus* inibiu a formação de hifas de *C. albicans* além de reduzir a liberação de proteinases e fosfolipases, além disso, reverteu a resistência aos medicamentos contra *C. albicans*, teve uma ação de inibição nas bombas de efluxo dos fármacos testadas (DUBE et al., 2020).

ROSE et al. (2020), demonstrou com método em ágar de sobreposição a atividade antifúngica do *L. rhamnosus* contra *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis* e *C. parapsilosis*, percebeu-se que todas as linhagens de *L. rhamnosus* teve atividade antifúngica e que todas as espécies de *Candida* apresentou diminuição no crescimento. Sendo que, *C. parapsilosis* houve o maior efeito de inibição e a *C. krusei* houve o menos efeito de inibição, no estudo sugere que o efeito de inibição do *L. rhamnosus* é

determinado pelo pH, nesse caso o ácido láctico produzido fortemente pelo *L. rhamnosus*, além de outros ácidos orgânicos como o ácido acético (JØRGENSEN et al., 2020).

Dados *in vitro* do estudo de MCKLOUD et al. (2021) demonstra que diferentes espécies de *Lactobacillus* podem manter a microbiota vaginal saudável, por meio da regulação da expressão gênica da *C. albicans* e a capacidade de reduzir compostos fúngicos na formação de biofilmes, sendo que, o *L. rhamnosus* foi a cepa que demonstrou o maior efeito de inibição na formação de biofilmes (MCKLOUD et al., 2021).

Compostos produzidos pelos *Lactobacillus* bloqueiam um dos principais fatores de virulência da *C. albicans*. Segundo o estudo de MACALPINE et al. (2021) o sobrenadante filtrado de *L. rhamnosus* bloqueou a transição da *C. albicans* de levedura para hifa. Foram testadas outras bactérias probiótica, sendo que, o *L. reuteri* também demonstrou efeito antifilamentação, resultando em um bloqueio na morfogênese das hifas. Nesse mesmo estudo foram avaliados alguns compostos produzidos pelos *Lactobacillus*, como o ácido láctico, porém percebeu-se que o composto 1-ABC era suficiente para bloquear a filamentação de *C. albicans*, no qual, a inibição da filamentação acontece pela ligação do composto 1-ABC na Yak1 do fungo (uma quinase da família DYRK1). Além disso, o estudo demonstrou que a estrutura da 1-etoxicarbonil- β -carbolina bloqueia a formação de biofilme de *C. albicans* (MACALPINE et al., 2021).

NaBut é conhecido por inibir histonas desacetilases (HDAC) e assim interferir no silenciamento gênico, sendo um potencial inibidor de fatores de virulência e do crescimento de leveduras. Modificações de histonas de *C. albicans* e *C. glabrata*, nas acetilações e metilações entre outras, atuam como papel na regulação das respostas ao estresse, resistência antifúngica e virulência desses fungos (GARNAUD et al., 2016a; NGUYEN et al., 2011a).

NGUYEN et al. (2011), demonstrou em seu estudo que dependendo da dose utilizado do NaBut, houve uma inibição do crescimento da *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. neoformans*, além da interferência e inibição dos fatores de virulência, como na formação de biofilme pela *Candida*, que está associado a resistência medicamentosa (NGUYEN et al., 2011a). Tal estudo reforça a ideia de que o NaBut afeta o crescimento de *Candida*. Todavia, no estudo de SMITH e EDLIND, (2002) foi observado um efeito sutil nas doses utilizadas do NaBut sobre os fatores de virulência e crescimento de *C. albicans*, porém quando aumentada a dose do NaBut, houve uma redução no crescimento fúngico (SMITH; EDLIND, 2002).

Outro estudo demonstrou que o NaBut não teve efeito no transporte precursor da quitina em *C. albicans*. A quitina é um dos principais componentes da parede celular de *Candida*

(BRAUN et al., 1987). Demonstrando que o NaBut não atua na estrutura do fungo, mas acredita-se que tem ações nas modulações epigenéticas.

A divergência nos resultados dos estudos supracitados corrobora com a hipótese que efeito do NaBut está associado com as metodologias empregadas, haja vista que no estudo de NGUYEN et al. (2011), foram utilizados meio de cultivo YPD (meio complexo rico em nutrientes) e preparo das células com soro bovino. Já no estudo de SMITH; EDLIND (2002), foram utilizados os meios YPD e RPMI com uma metodologia diferente.

Capítulo 2:

Capítulo 2 - *Lactobacillus* spp. e Butirato de Sódio versus *Cryptococcus neoformans*

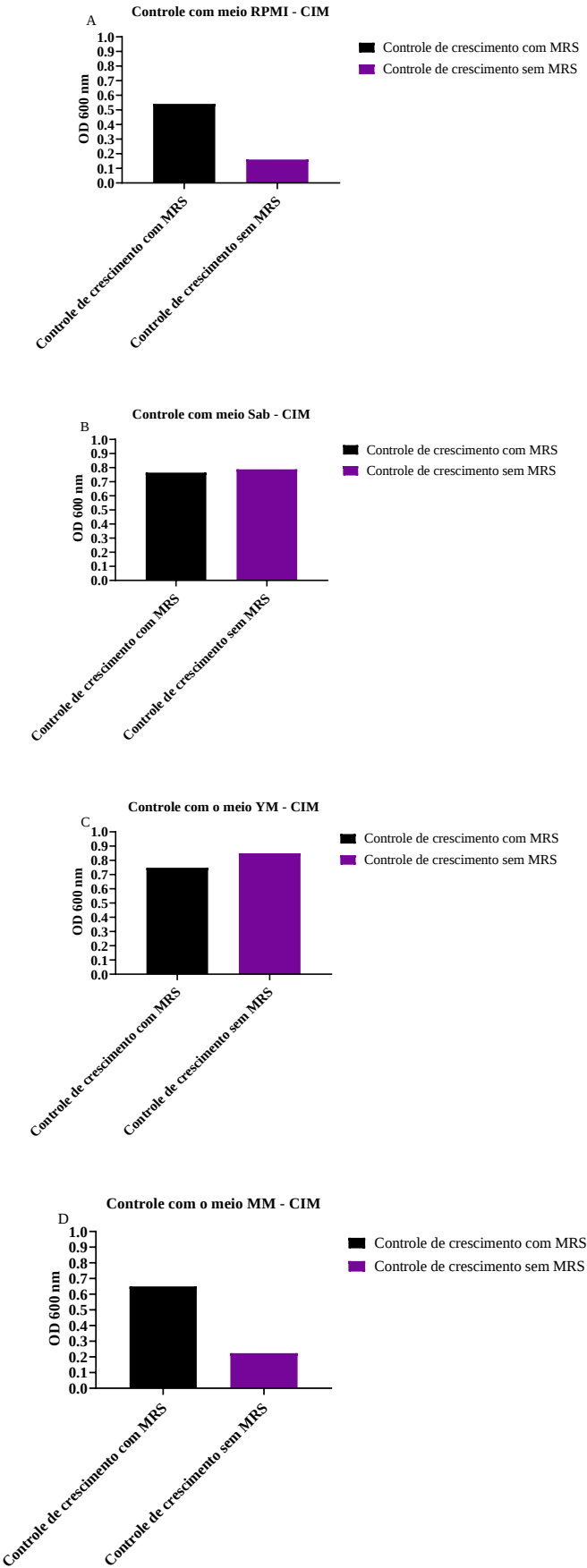
7. Resultados

O mesmo racional empregado no desenho experimental no capítulo anterior foi seguido neste capítulo, de modo a permitir investigar os efeitos de pós-bióticos sobre o crescimento de leveduras de *C. neoformans*.

Foram avaliadas curvas de crescimento da linhagem de *C. neoformans* (H99) nos meios RPMI, Sabouraud (Sab), YM e MM, comparados com RPMI, Sab, YM, MM acrescido de 50% do meio para *Lactobacillus*, MRS. Para todos os testes, foi considerado como controle de crescimento, o meio de crescimento acrescido de 50% de MRS, haja vista que foi a concentração máxima empregada nos testes de CIM. O racional para escolha desse modelo de controle se deu para evitar vieses de algum efeito do meio MRS sobre o crescimento da levedura, o que poderia interferir na análise real dos pós-bióticos, visto que, para estas análises é necessário adicionar o sobrenadante de culturas dos *Lactobacillus* previamente cultivados no MRS.

Observa-se na Figura 13A e 13D que as leveduras de *C. neoformans* nos meios de cultivo RPMI e MM, acrescidos de 50% de MRS, cresceram acima da média em comparação ao controle de crescimento (sem meio MRS). Este resultado sugere que o meio MRS interfere positivamente sobre o crescimento de *C. neoformans* nas condições testadas, que para o objeto deste estudo não é um viés que sobrepõe ao dado esperado, pelo contrário. Já para os meios de cultivos YM e Sabouraud (Figura 13B e 13C) acrescidos de MRS, houve uma redução sutil no crescimento de *C. neoformans* em comparação aos poços que tinham somente os meios de cultivos YM e Sabouraud.

Figura 13 - Análise do crescimento de *C. neoformans* (H99) nos meios de cultivo *versus* o crescimento de *C. neoformans* nos meios de cultivos acrescidos de 50% de MRS



Legenda: Crescimento controle de leveduras de *C. neoformans* com os meios de cultivos RPMI, MM, Sabouraud (Sab) ou YM *versus* RPMI, MM, Sab ou YM acrescido de 50% de MRS. A análise foi realizada no intervalo de crescimento de 24 horas. O eixo Y indica a densidade óptica (600 nm). No eixo X os gráficos A, B, C e D são os controles positivos, na cor preta há o controle de crescimento acrescido de 50% de MRS + leveduras de *C. neoformans*. Na cor **roxa** o grupo controle de crescimento sem MRS, em que há apenas a *C. neoformans* e os meios RPMI, MM, Sab ou YM

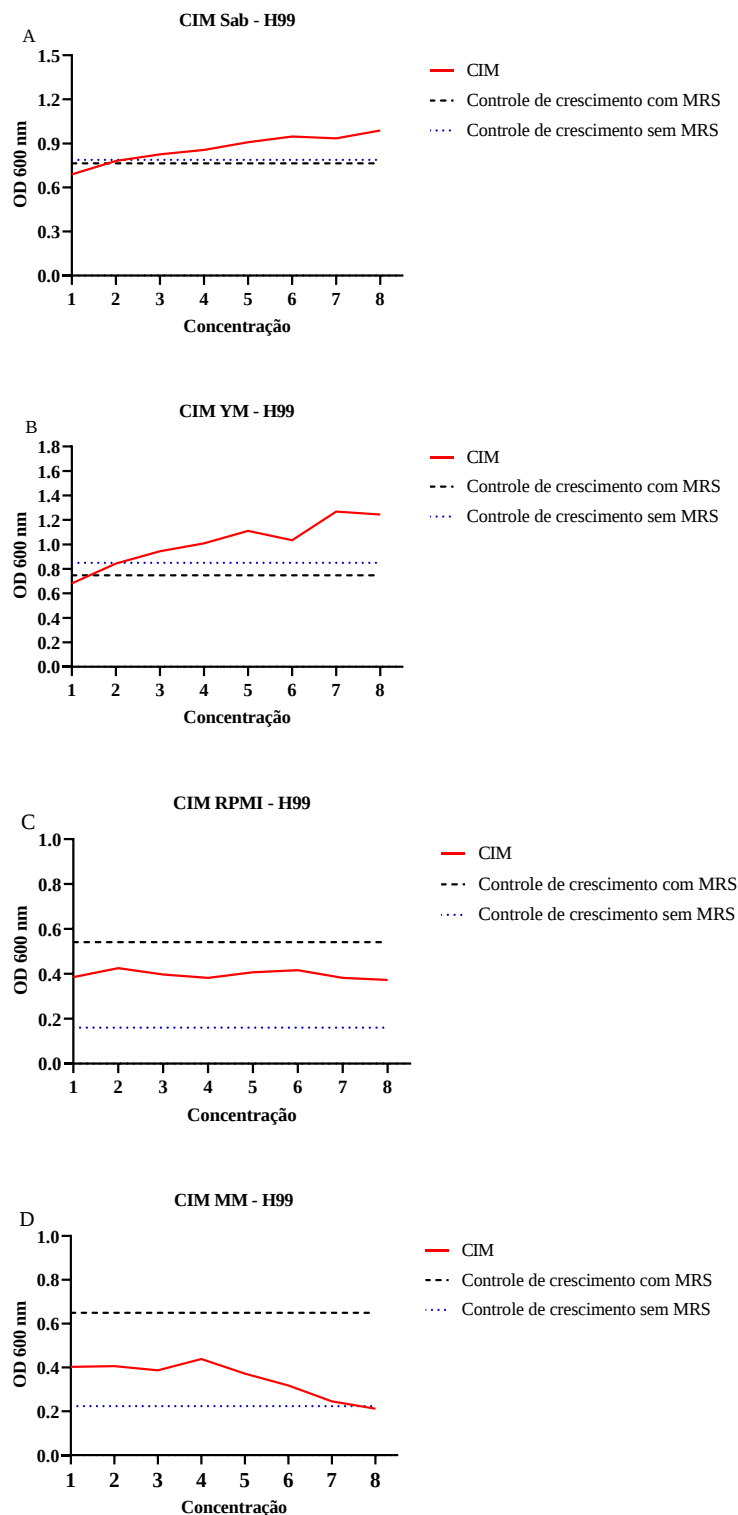
O crescimento positivo das leveduras no meio com MRS descarta o viés de possíveis inibições promovidas pelo meio nos testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM), pois o pós-biótico se mantém no meio MRS após a filtragem, estando presente no poço de análise. Os dados da Figura 13 permitem escolher o controle mais adequado para análises subsequentes, garantindo robustez na interpretação dos dados, além de remover os vieses da presença do meio MRS sobre o crescimento de levedura de *C. neoformans*. Para todos os ensaios de CIM foi considerado como controle de crescimento o meio de cultivo, acrescido de levedura, e do meio MRS na concentração de 50%, visto que esta foi a concentração máxima aplicada em todos os testes de pós-bióticos de *Lactobacillus* sp. Todavia, foi mantido também a linha de crescimento que representa o crescimento do fungo somente no meio de cultivo, em todas as figuras.

7.1. *L. casei*

Nos meios complexos Sabouraud e YM (Figura 14A e 14B) o pós-biótico do *L. casei* houve uma pequena redução sobre crescimento do *C. neoformans*, na concentração de 50% do pós-biótico. No RPMI (Figura 14C) o pós-biótico de *L. casei* tem o efeito de redução do crescimento em todas as concentrações testadas. Como discutido no capítulo anterior sobre *C. glabrata*, o RPMI é o meio indicado para realização de CIM segundo o BrCAST, pois tem uma precisão maior no ponto final e resultou no melhor crescimento fúngico. Além disso, o MRS em relação ao *C. neoformans*, facilita o crescimento fúngico e pode ser devido diversos fatores, como nutrientes, açúcares, entre outros compostos.

No meio MM (Figura 14D) o pós-biótico do *L. casei* também demonstrou redução sobre o crescimento do fungo em todas concentrações testadas. Entretanto, diferente dos outros meios avaliados, nas menores concentrações do pós-biótico foi possível observar um declínio na linha de crescimento do fungo, chegando ao nível de crescimento de *C. neoformans* na presença somente do meio de cultivo MM, sem a presença MRS.

Figura 14 - Efeito dose-dependente do pós-biótico de *L. casei* sobre o crescimento de leveduras de *C. neoformans* (H99)



Legenda: A análise foi realizada no intervalo de crescimento de 24 horas. O eixo Y indica a densidade óptica (600 nm), o eixo X indica a concentrações seriadas dos compostos analisados (1 = [50%]; 2 = [25%]; 3 = [12.5%]; 4 = [6.25%]; 5 = [3.12%]; 6 = [1.56%]; 7 = [0.78%]; 8 = 0.39%). Na linha preta traçada há o controle de crescimento que contém o meio de cultivo (RPMI, MM, Sab ou YM) acrescido do MRS e *C. neoformans*. Na linha azul

pontilhada há o controle de crescimento em que há apenas o meio de cultivo (RPMI, MM, Sab ou YM) sem a presença do MRS. Na linha **vermelha** há a análise de *C. neoformans* e concentrações seriadas do pós-biótico de *L. casei*. A numeração (1-8) no eixo X indica o sentido de concentração dos compostos testados, esses valores representam diluição seriada dos compostos analisados (da maior a menor concentração). As figuras são a representação de triplicata biológica com dados similares

Os dados da Figura 14D, 15D, 16D e 17D sugerem que o MRS promove o crescimento de *C. neoformans* quando acrescido ao meio MM. O meio de cultivo MM é apresenta redução de açúcares e nutrientes (o que sugere o emprego da nomenclatura usual para este meio – Meio Mínimo). É um meio de cultivo indicado para indução de fatores de virulência de *C. neoformans*, particularmente expansão da cápsula.

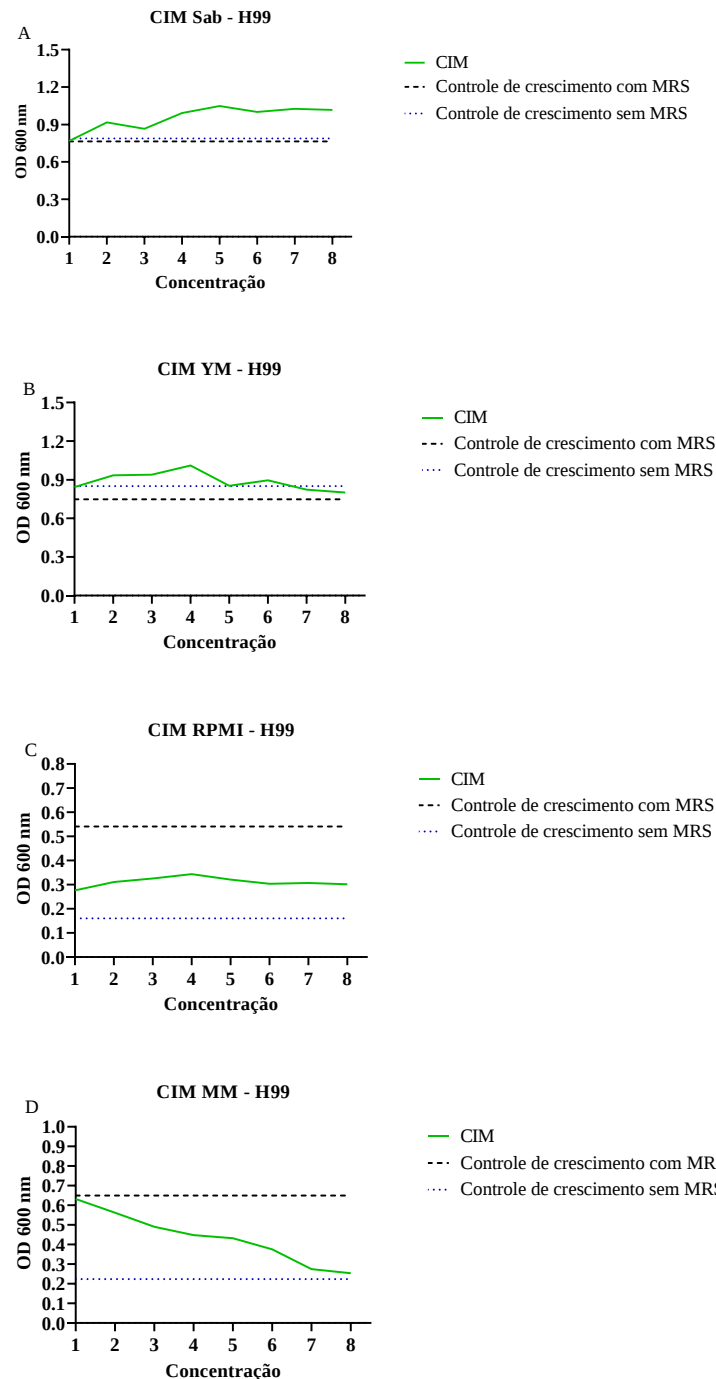
Para indução *in vitro* dos atributos de virulência, *C. neoformans* necessita passar por estresses externos. Interessantemente, na presença de MRS as leveduras crescem mais que quando compradas ao crescimento apenas no MM. Já na presença de diferentes concentrações dos pós-bióticos, o que se observa é uma redução da ordem de 2x, em relação à linha controle. O efeito supressor do pós-biótico é tão acentuado que supera o efeito positivo do MRS (Figura 13D), afirmando que o pós-biótico é o responsável pela redução do crescimento, independente da presença do MRS. Os resultados dos 4 pós-bióticos no meio de MM são semelhantes.

7.2. *L. casei* Shirota

Observa-se que *C. neoformans* nos meios de cultivo Sabouraud e YM (Figura 15A) com o pós-bióticos de *L. casei* Shirota, não apresentou inibição do crescimento fúngico nas concentrações testadas. No meio YM com o pós-biótico do *L. casei* Shirota (Figura 15B) foi observado um comportamento de crescimento do *C. neoformans* semelhante ao comportamento de *C. neoformans* na presença do meio de cultivo MM (Figura 15D), quando menor a concentração do pós-biótico, menor o crescimento fúngico. Todavia, o pós-biótico do *L. casei* Shirota não demonstrou a redução do crescimento fúngico em comparação ao controle de crescimento do meio de cultivo YM acrescido com MRS.

RPMI e MM (Figura 15C e 15D) na presença do pós-bióticos de *L. casei* Shirota, demonstrou o mesmo efeito do pós-biótico de *L. casei* nos meios testados. Corroborando, uma vez mais, a hipótese sugerida no capítulo anterior, que o meio de cultivos e os pós-bióticos espécie-específicos influenciam os resultados dos ensaios.

Figura 15 - Efeito dose-dependente do pós-biótico de *L. casei* Shirota sobre o crescimento de leveduras de *C. neoformans* (H99)



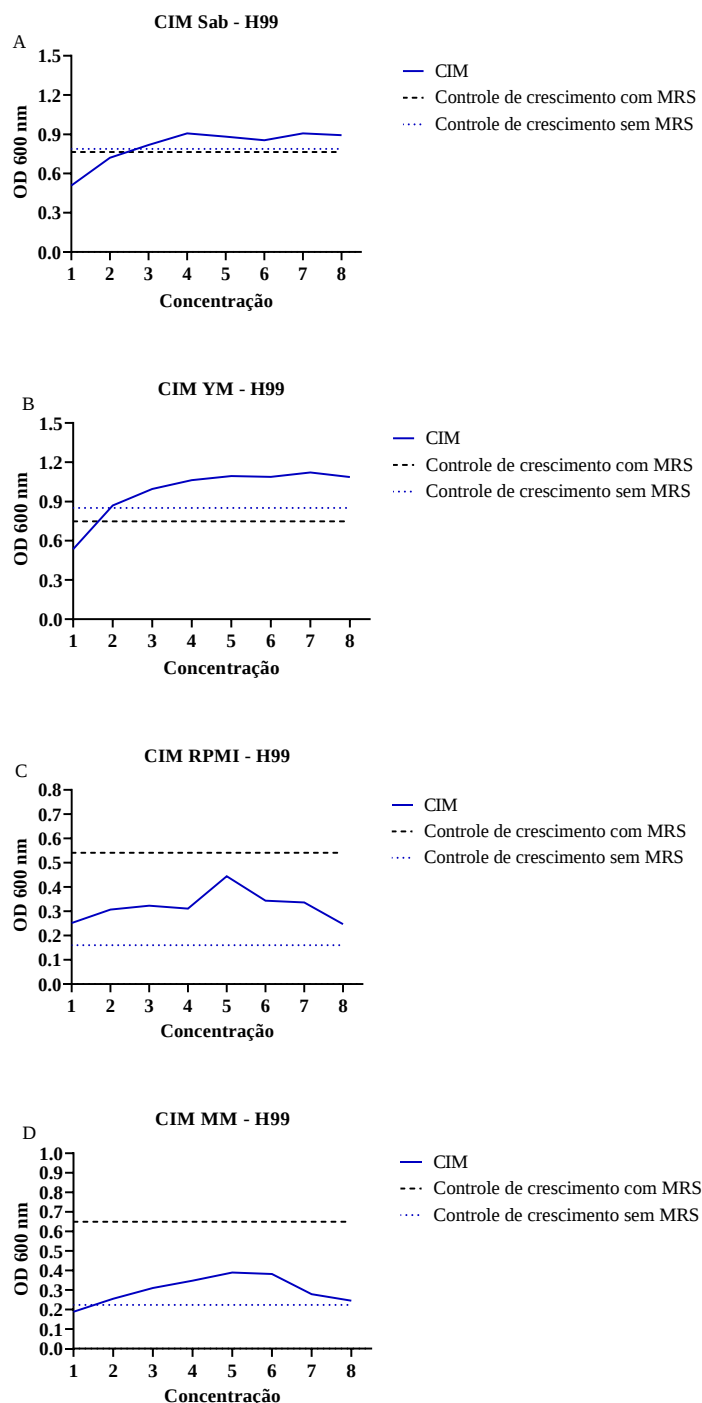
Legenda: A análise foi realizada no intervalo de crescimento de 24 horas. O eixo Y indica a densidade óptica (600 nm), o eixo X indica a concentrações seriadas dos compostos analisados (1 = [50%]; 2 = [25%]; 3 = [12.5%]; 4 = [6.25%]; 5 = [3.12%]; 6 = [1.56%]; 7 = [0.78%]; 8 = 0.39%). Na linha preta traçada há o controle de crescimento que contém o meio de cultivo (RPMI, MM, Sab ou YM) acrescido do MRS e *C. neoformans*. Na linha azul pontilhada há o controle de crescimento em que há apenas o meio de cultivo (RPMI, MM, Sab ou YM) sem a presença do MRS. Na linha verde há a análise de *C. neoformans* e concentrações seriadas do pós-biótico de *L. casei* Shirota. A numeração (1-8) no eixo X indica o sentido de concentração dos compostos testados, esses valores

representam diluição seriada dos compostos analisados (da maior a menor concentração). As figuras são a representação de triplicata biológica com dados similares

7.3. *L. reuteri*

Observa-se que o efeito do pós-biótico de *L. reuteri*, reduziu o crescimento de *C. neoformans* nas duas primeiras concentrações no meio de cultivo Sabouraud (50% e 25%) (Figura 16A). No meio de cultivo YM o pós-bióticos do *L. reuteri* reduziu o crescimento do *C. neoformans*, somente na concentração de 50% (Figura 16B) e nos meios de cultivo RPMI e MM, houve a redução do crescimento em todas as concentrações do pós-biótico do *L. reuteri* (Figura 16C e 16D), os resultados reforçam os outros dados referentes aos *L. casei* e *L. casei* Shirota no meio de cultivo RPMI e MM. Entretanto, no meio de cultivo RPMI na presença do pós-biótico de *L. reuteri* o resultado é semelhante ao do meio de cultivo MM, no qual, quanto menor a concentração do pós-biótico menor o crescimento fúngico.

Figura 16 - Efeito dose-dependente do pós-biótico de *L. reuteri* sobre o crescimento de leveduras de *C. neoformans* (H99)

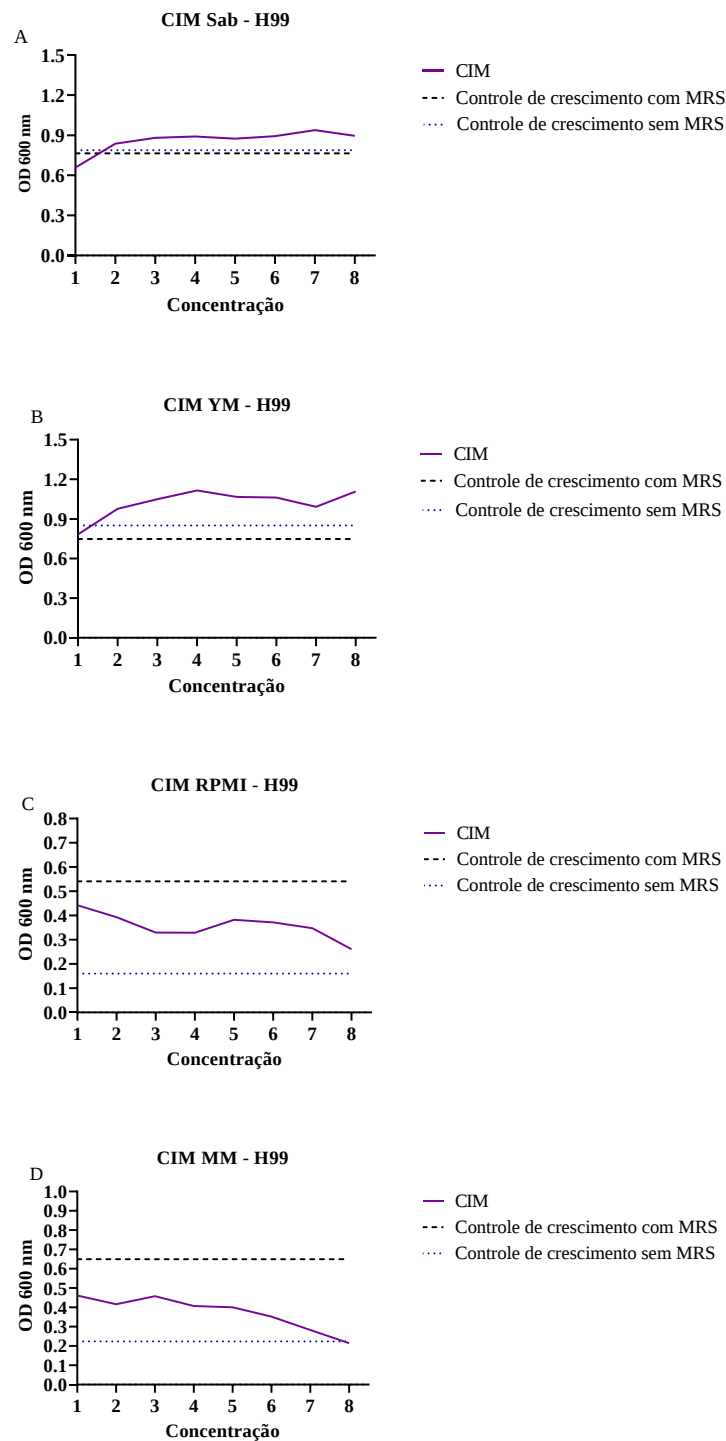


Legenda: A análise foi realizada no intervalo de crescimento de 24 horas. O eixo Y indica a densidade óptica (600 nm), o eixo X indica a concentrações seriadas dos compostos analisados (1 = [50%]; 2 = [25%]; 3 = [12.5%]; 4 = [6.25%]; 5 = [3.12%]; 6 = [1.56%]; 7 = [0.78%]; 8 = 0.39%). Na linha preta traçada há o controle de crescimento que contém o meio de cultivo (RPMI, MM, Sab ou YM) acrescido do MRS e *C. neoformans*. Na linha azul pontilhada há o controle de crescimento em que há apenas o meio de cultivo (RPMI, MM, Sab ou YM) sem a presença do MRS. Na linha azul-escuro há a análise de *C. neoformans* e concentrações seriadas do pós-biótico de *L. reuteri*. A numeração (1-8) no eixo X indica o sentido de concentração dos compostos testados, esses valores representam diluição seriada dos compostos analisados (da maior a menor concentração). As figuras são a representação de triplicata biológica com dados similares

7.4. *L. rhamnosus*

Observa-se o mesmo efeito do pós-biótico de *L. rhamnosus* no meio de cultivo Sabouraud (Figura 17A), reduziu o crescimento do *C. neoformans* na concentração de 50%. No meio de cultivo YM (Fig. 17B) o pós-biótico do *L. rhamnosus* não houve a redução do crescimento do *C. neoformans* nas concentrações testadas. Nos meios de cultivos RPMI e MM (Figuras 17C e 17D) observa-se o mesmo efeito nos pós-bióticos dos quatro *Lactobacillus* estudados, no qual, *C. neoformans* reduziu o crescimento em todas as concentrações do pós-biótico, além de um resultado também semelhante aos demais dados apresentados, quanto menor a concentração do pós-biótico, menor o crescimento fúngico.

Figura 17 - Efeito dose-dependente do pós-biótico de *L. rhamnosus* sobre o crescimento de leveduras de *C. neoformans* (H99)



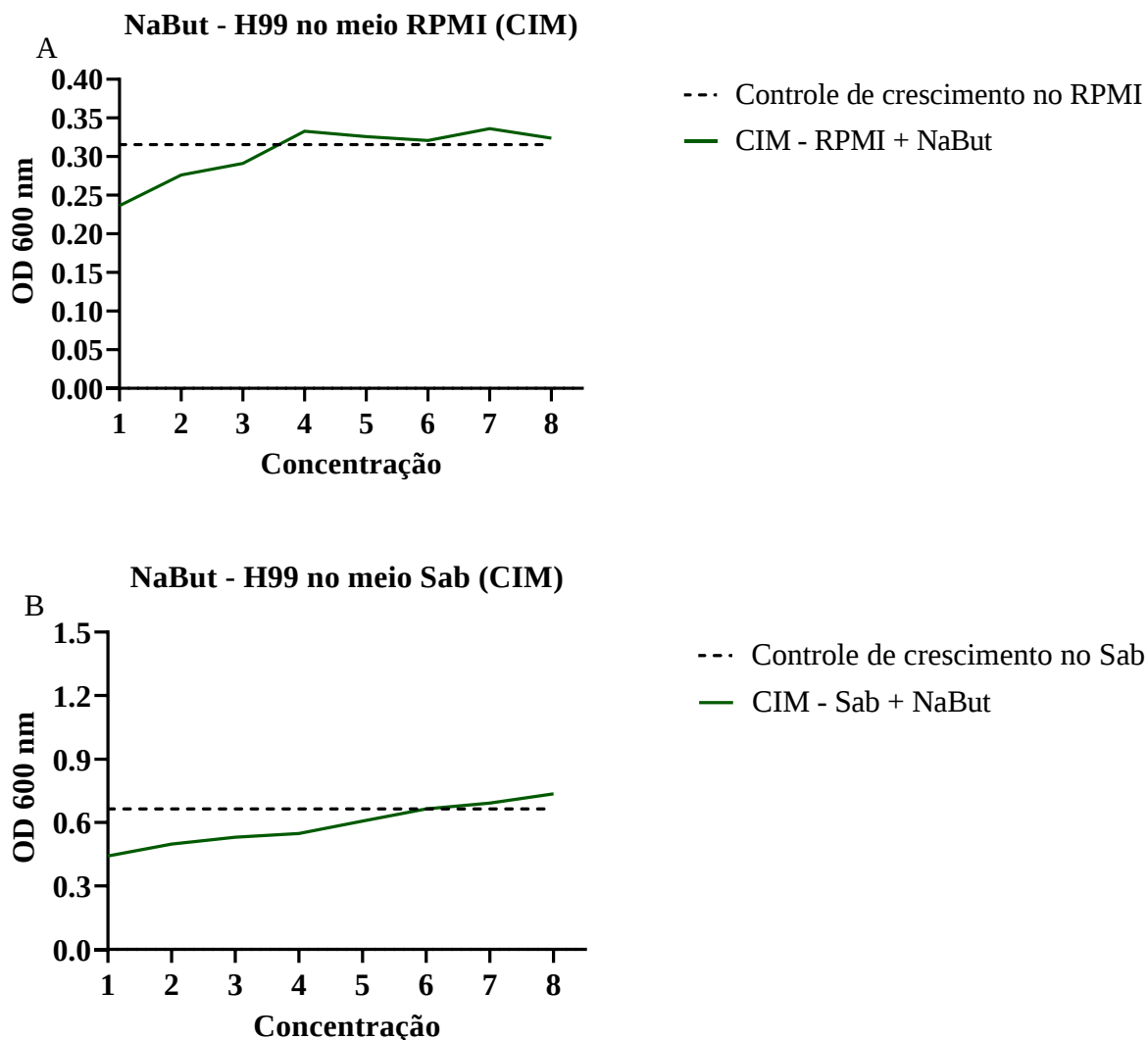
Legenda: A análise foi realizada no intervalo de crescimento de 24 horas. O eixo Y indica a densidade óptica (600 nm), o eixo X indica a concentrações seriadas dos compostos analisados (1 = [50%]; 2 = [25%]; 3 = [12.5%]; 4 = [6.25%]; 5 = [3.12%]; 6 = [1.56%]; 7 = [0.78%]; 8 = 0.39%). Na linha preta traçada há o controle de crescimento que contém o meio de cultivo (RPMI, MM, Sab ou YM) acrescido do MRS e *C. neoformans*. Na linha azul pontilhada há o controle de crescimento em que há apenas o meio de cultivo (RPMI, MM, Sab ou YM) sem a presença do MRS. Na linha roxa há a análise de *C. neoformans* e concentrações seriadas do pós-biótico de *L. casei* Shirota. A numeração (1-8) no eixo X indica o sentido de concentração dos compostos testados, esses valores

representam diluição seriada dos compostos analisados (da maior a menor concentração). As figuras são a representação de triplicata biológica com dados similares

7.5. Butirato de Sódio

É possível observar que houve diminuição no crescimento fúngico em ambos os meios de cultura utilizados na presença do NaBut. Sendo que, no meio RPMI (Figura 18A) ocorreu a redução do crescimento do *C. neoformans* nos três primeiros poços da concentração de NaBut [55 mM - 13,75 mM]. No meio Sabouraud (Figura 18B) houve a redução fúngica até o sexto poço da concentração do reagente [55 mM - 1,718 mM].

Figura 18 - Efeito dose-dependente de NaBut sobre o crescimento de *C. neoformans*



Legenda: A análise foi realizada no intervalo de crescimento de 24 horas. O eixo Y representa a densidade óptica (OD 600 nm), o eixo X (1-8) representa as concentrações seriadas de NaBut (1 = [55 mM], 2 = [27,5 mM], 3 = [13,75 mM], 4 = [6,875 mM], 5 = [3,437 mM], 6 = [1,718 mM], 7 = [0,859 mM] e 8 = [0,429 mM]), do mais concentrado para o menos concentrado. A linha preta traçada indica o controle de crescimento, em que apenas a *C. neoformans* e os meios de cultura, RPMI ou Sabouraud (Sab). Na linha verde-escura o grupo tratado com concentrações seriadas do NaBut. As figuras são a representação de duplicata biológica com dados similares

7.6. Resumo dos resultados

A tabela 4 também apresenta um compilado dos resultados obtidos para melhor compreensão dos dados obtidos.

Tabela 4: Resumo dos resultados dos pós-bióticos dos *Lactobacillus* spp. e NaBut, nos diferentes meios avaliados, sobre o crescimento de *C. neoformans*

<i>C. neoformans</i>	<i>L. casei</i> (v/v)	<i>L. casei</i> Shirota (v/v)	<i>L. reuteri</i> (v/v)	<i>L. rhamnosus</i> (v/v)	NaBut (mM)
Sab	Reduziu o crescimento na concentração de 50%	Não reduziu o crescimento	Reduziu o crescimento na concentração de 50% e 25%	Reduziu o crescimento na concentração de 50%	Reduziu o crescimento na concentração de 55 mM - 1,718 mM
YM	Reduziu o crescimento na concentração de 50%	Não reduziu o crescimento	Reduziu o crescimento na concentração de 50%	Não reduziu o crescimento	X
RPMI	Reduziu o crescimento em todas as concentrações testadas	Reduziu o crescimento em todas as concentrações testadas	Reduziu o crescimento em todas as concentrações testadas	Reduziu o crescimento em todas as concentrações testadas	Reduziu o crescimento na concentração de 55 mM - 13,75 mM
MM	Reduziu o crescimento em todas as concentrações testadas	Reduziu o crescimento em todas as concentrações testadas	Reduziu o crescimento em todas as concentrações testadas	Reduziu o crescimento em todas as concentrações testadas	X

8. Discussão

É amplamente estudado os efeitos de probiótico contra patógenos resistente, relatando a eficácia da utilização do probiótico no tratamento da doença e melhora no desempenho do sistema imunitário. Todavia estudos referentes a pós-bióticos e seus efeitos em fungos patogênicos e resistentes a fármacos são escassos e estudos referentes a efeitos de pós-bióticos de *Lactobacillus* spp. em *C. neoformans* são raros.

Diferentes estudos demonstram os benefícios na utilização de probióticos, prebióticos e pós-bióticos em doenças imunológicas e processos inflamatórios, sendo que os pós-bióticos vêm demonstrado atividades antimicrobianas e são capazes de modular a microbiota, além de conferir vantagens sobre os probióticos, visto que há ausência do aumento de uma colonização de uma bactéria específica e o agravamento de uma inflamação (MORNIROLI et al., 2021; VINDEROLA; SANDERS; SALMINEN, 2022).

Um dos principais pós-bióticos descrito foi a reuterina, composto derivado do glicerol e fermentado pelo *L. reuteri*, esse metabólico tem ação antimicrobiana em diversos micro-organismo, como a *C. albicans* e outros metabólitos de subespécie de *L. casei* tem a ação de apoptose de células imunes humanas sem afetar as células epiteliais intestinais (CICENIA et al., 2014).

A resistência antifúngica vem aumentando ao decorrer dos anos e são poucos os antifúngicos disponíveis, além de serem tóxicos para o organismo humano (LIN, 2009). O principal tratamento para criptococose é a administração da anfotericina B com flucitocina e em seguida com fluconazol. Todavia linhagens de *Cryptococcus* resistentes a esses fármacos vêm sendo encontras (AGUDELO et al., 2015). Em vista disso, novas abordagens terapêuticas com menor impacto sobre seleção de linhagens resistentes, como os pós-bióticos, surgem como promissoras (CICENIA et al., 2014). Neste contexto, o presente trabalho teve o interesse de avaliar o efeito do sobrenadante de cultura (pós-bióticos) de *Lactobacillus* spp. sobre o crescimento de *C. neoformans*.

Um estudo utilizou a técnica de terapia fotodinâmica antimicrobiana e observou que ao utilizar essa metodologia com *L. rhamnosus*, por vias de administrações intragástricas e intranasal, o probiótico não apresentou melhora na sobrevida de camundongos infectados com *C. gattii*, também não apresentou melhoras significativas em comparação com o grupo testado somente com o fluconazol e sinergismos do fluconazol com o probiótico (OLIVEIRA et al., 2017). Talvez esses resultados apresentem um viés metodológico que alguns autores descrevem a necessidade de o probiótico colonizar a região, para então se observar efeito. Diferentemente

dos pós-bióticos, que por serem inanimados, não carecem de colonização, e podem ser veiculados em altas concentrações em única dose.

A depender da metodologia utilizada e pós-bióticos espécie-específica de *Lactobacillus* spp., os resultados podem ser promissores ou não. A utilização de probióticos para o benefício na saúde humana é amplamente estudada e comprovada. Todavia, os mecanismos de ação e os benefícios dos pós-bióticos são pouco elucidados na literatura, e os protocolos de ensaios ainda são escassos. Em razão disso, a metodologia utilizada foi padronizada baseando-se no protocolo do BrCAST para microdiluição em caldo, para ensaios com leveduras. Embora neste estudo foram realizadas algumas modificações, de modo a permitir a condução dos ensaios e testes em diferentes meios de cultivo, visto que não há uma metodologia específica para estudar os efeitos de pós-bióticos. Ademais, praticamente não existem estudos dos efeitos dos pós-bióticos na inibição ou redução do crescimento de leveduras de *C. neoformans*.

O NaBut é considerado um composto bacteriano importante, que tem função de HDACi (BRANDÃO et al., 2015; GARNAUD et al., 2016b; QIU et al., 2015). Os estudos de NaBut atuando como HDACi são mais inclinados a doenças oncológicas, imunológicas e inflamatórias devido aos mecanismos epigenéticos. Visto que há regulação na expressão gênica, essas regulações estão envolvidas em processos apoptose, ciclo celular, diferenciação celular e resposta imune (KAŹMIERCZAK-SIEDLECKA et al., 2022; ZHOU et al., 2021) que favorece estudos voltados para controle microbiológico, em razão que o NaBut também tem função antimicrobiana (NGUYEN et al., 2011a).

O estudo de RANJAN et al. (2021) observou que o NaBut reduziu o crescimento de linhagens de *C. neoformans* resistentes a fluconazol e linhagens de *C. neoformans* mutantes em teste de CIM utilizando o meio RPMI 16400, o mesmo meio empregado neste estudo. Foi também observado o efeito de redução no crescimento fúngico com combinação de terapia fotodinâmica, em que NaBut e outros moduladores epigenéticos potencializaram a atividade antimicrobiana e demonstraram um aumento no efeito do fluconazol, quando utilizado em combinação como o NaBut (RANJAN et al., 2021). Em conjunto, esses dados sugerem que alterações epigenéticas interferem na suscetibilidade aos medicamentos e na viabilidade celular de *Cryptococcus* (MORAIS et al., 2020; RANJAN et al., 2021).

Outro estudo demonstrou uma redução no crescimento de *C. neoformans* em até 40% quando utilizado 10 mM de NaBut, e 60% a 82% quando utilizado 20 mM-60 mM de NaBut em testes de CIM. Observou-se que o NaBut tem efeito sobre os principais fatores de virulência de *C. neoformans*, pois inibiu a formação de biofilmes, formação de cápsula e formação de

melanina em todas as concentrações testadas. Nota-se que NaBut um inibidor de HDAC influencia nos fatores de virulência do *Cryptococcus* (NGUYEN et al., 2011b).

BRANDÃO et al. (2015) demonstraram uma redução significativa do crescimento do *C. neoformans* na concentração de 20 mM de NaBut, embora no estudo as concentrações de 5mM e 1 mM também apresentaram redução do fungo. Foi observado que HDACi não interferiu na viabilidade celular, mas NaBut teve efeito prejudicial na formação da cápsula de *C. neoformans*. Além disso, NaBut interferiu em outros fatores de virulência, como a atividade de fosfolipase, enzimas que atuam na conformação da membrana celular, inibindo a formação do halo das fosfolipases em todas as concentrações testadas. Interferiu também no desenvolvimento de hifas de acasalamento e na formação de melanina de *C. neoformans* (BRANDÃO et al., 2015).

9. Conclusão

Este estudo comprovou a hipótese de que os produtos metabólicos derivados de *Lactobacillus* spp. têm a capacidade de reduzir o crescimento de leveduras patogênicas, representando uma potencial estratégia terapêutica. Os pós-bióticos de *L. casei*, *L. casei* Shirota, *L. reuteri*, *L. rhamnosus* e NaBut demonstraram efeitos inibitórios sobre o crescimento das leveduras, sendo influenciados pelo meio de cultura e pela espécie de LAC produtora.

Concentrações entre 50% e 0,39% v/v dos quatro pós-bióticos testados reduziram o crescimento *in vitro* de *C. glabrata* e *C. neoformans* no meio RPMI, assim como para *C. neoformans* no meio MM. *L. reuteri*, a 50%, diminuiu o crescimento de *C. glabrata* nos meios condicionados, enquanto em Sabouraud, reduziu o crescimento de *C. neoformans* a 25% e 50%; em YM, a redução ocorreu a 50%. *L. rhamnosus*, a 50%, reduziu o crescimento de *C. neoformans* em Sabouraud, e *L. casei*, em Sabouraud e YM.

NaBut apresentou redução no crescimento de *C. glabrata* em todas as concentrações testadas 55 mM – 1,718 mM no meio Sabouraud, e de *C. neoformans* nas concentrações de 55 mM a 1,718 mM no meio Sabouraud, e de 55 mM a 13,75 mM no meio RPMI.

Ademais, observou-se que o efeito inibitório dos pós-bióticos dos *Lactobacillus* foi menos expressivo em meios mais ricos em nutrientes e açúcares, como Sabouraud e YM, comparado com RPMI 1640 e meio condicionado.

É relevante destacar que os resultados relacionados a *C. glabrata* corroboram estudos prévios sobre probióticos/pós-bióticos em *Candida albicans*, com efeitos antimicrobianos evidentes. No obstante, é necessário identificar os metabólitos responsáveis pelas ações fungistáticas ou fungicidas nos pós-bióticos de *Lactobacillus* para desenvolver futuramente produtos biotecnológicos contra infecções fúngicas resistentes.

Finalmente, os dados indicam que os pós-bióticos podem se tornar uma terapia coadjuvante, com menor impacto na seleção de linhagens resistentes em comparação com antimicrobianos atuais. Isso abre novas possibilidades terapêuticas, proporcionando economicidade e ampla disponibilidade clínica, especialmente em regiões economicamente vulneráveis.

10. Referência

- AGUDELO, C. A. et al. Response to therapy in patients with cryptococcosis and AIDS: Association with in vitro susceptibility to fluconazole. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 32, n. 4, p. 214–220, out. 2015.
- AL-DHAHERI, R. S.; DOUGLAS, L. J. Apoptosis in *Candida* biofilms exposed to amphotericin B. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, n. 2, p. 149–157, 1 fev. 2010.
- ALSPAUGH, J. A. Virulence mechanisms and *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. **Fungal Genetics and Biology**, v. 78, p. 55–58, maio 2015.
- ALVES, R. et al. Transcriptional responses of *Candida glabrata* biofilm cells to fluconazole are modulated by the carbon source. **npj Biofilms and Microbiomes**, v. 6, n. 1, p. 4, 23 jan. 2020.
- ANVISA. RDC Nº 241. RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA – RDC Nº 241, DE 26 DE JULHO DE 2018. . 26 jul. 2018.
- ANVISA; MINISTÉRIO DA SAÚDE. RDC Nº 718. RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 718, DE 1º DE JULHO DE 2022. . 1 jul. 2022.
- BAHN, Y.-S. et al. Microbe Profile: *Cryptococcus neoformans* species complex: This article is part of the Microbe Profiles collection. **Microbiology**, v. 166, n. 9, p. 797–799, 1 set. 2020.
- BEISNER, J. et al. Prebiotic Inulin and Sodium Butyrate Attenuate Obesity-Induced Intestinal Barrier Dysfunction by Induction of Antimicrobial Peptides. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 678360, 11 jun. 2021.
- BENNETT, J. E. Flucytosine. **Annals of Internal Medicine**, v. 86, n. 3, p. 319, 1 mar. 1977.
- BERMAS, A.; GEDDES-MCALISTER, J. Combatting the evolution of antifungal resistance in *Cryptococcus neoformans*. **Molecular Microbiology**, v. 114, n. 5, p. 721–734, nov. 2020.
- BEYER, R. et al. Competition of *Candida glabrata* against *Lactobacillus* is Hog1 dependent. **Cellular Microbiology**, v. 20, n. 12, p. e12943, dez. 2018.
- BOTTERY, M. J.; PITCHFORD, J. W.; FRIMAN, V.-P. Ecology and evolution of antimicrobial resistance in bacterial communities. **The ISME Journal**, v. 15, n. 4, p. 939–948, abr. 2021.
- BRANDÃO, F. A. et al. Histone deacetylases inhibitors effects on *Cryptococcus neoformans* major virulence phenotypes. **Virulence**, v. 6, n. 6, p. 618–630, 18 ago. 2015.
- BRAUN, P. C. et al. Effect of cerulenin and sodium butyrate on chitin synthesis in *Candida albicans*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 6, p. 546–550, 1 jun. 1987.
- BUGGIO, L. et al. Probiotics and vaginal microecology: fact or fancy? **BMC Women's Health**, v. 19, n. 1, p. 25, dez. 2019.
- CASADEVALL, A. et al. The capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Virulence**, v. 10, n. 1, p. 822–831, 1 jan. 2019.

- CATANOZE, I. A. et al. Antagonistic effect of isolated and commercially available probiotics on the growth of *Candida albicans* on acrylic resin denture surfaces. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, v. 127, n. 2, p. 338–344, fev. 2022.
- CAVALCANTE, J. P. et al. Prevalence, antifungal susceptibility and virulence determinants of oral yeast species isolated from immunodeficient patients in Northeastern Brazil. p. 8, 2020.
- CECCARANI, C. et al. Diversity of vaginal microbiome and metabolome during genital infections. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 14095, dez. 2019.
- CHEW, S. Y. et al. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GR -1 and *Lactobacillus reuteri* RC -14 exhibit strong antifungal effects against vulvovaginal candidiasis-causing *Candida glabrata* isolates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, n. 5, p. 1180–1190, maio 2015.
- CICENIA, A. et al. Postbiotic Activities of Lactobacilli-derived Factors. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 48, n. Supplement 1, p. S18–S22, nov. 2014.
- D'ANDREA, M. M. et al. The Urgent Need for Novel Antimicrobial Agents and Strategies to Fight Antibiotic Resistance. **Antibiotics**, v. 8, n. 4, p. 254, 6 dez. 2019.
- DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 3, p. 417–433, set. 2010.
- DE GREGORIO, P. R. et al. Biosurfactant from vaginal *Lactobacillus crispatus* BC1 as a promising agent to interfere with *Candida* adhesion. **Microbial Cell Factories**, v. 19, n. 1, p. 133, dez. 2020.
- DENNING, D. W. et al. Global burden of recurrent vulvovaginal candidiasis: a systematic review. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 11, p. e339–e347, nov. 2018.
- DUBE, Y. et al. *Lactobacillus rhamnosus* cell-free extract targets virulence and antifungal drug resistance in *Candida albicans*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 733–747, dez. 2020.
- FAVERO, C. et al. Postbiotics and Kidney Disease. **Toxins**, v. 14, n. 9, p. 623, 6 set. 2022.
- GARNAUD, C. et al. Histone Deacetylases and Their Inhibition in *Candida* Species. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 5 ago. 2016a.
- GARNAUD, C. et al. Histone Deacetylases and Their Inhibition in *Candida* Species. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 5 ago. 2016b.
- GERBALDO, G. A. et al. Antifungal activity of two *Lactobacillus* strains with potential probiotic properties. **FEMS Microbiology Letters**, v. 332, n. 1, p. 27–33, jul. 2012.
- GIBSON, G. R. et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 14, n. 8, p. 491–502, ago. 2017.
- GIONO-CEREZO, S. et al. Resistencia antimicrobiana. Importancia y esfuerzos por contenerla. **Gaceta Médica de México**, v. 156, n. 2, p. 3610, 19 fev. 2020.

GÓMEZ-GAVIRIA, M.; RAMÍREZ-SOTELO, U.; MORA-MONTES, H. M. Non-albicans *Candida* Species: Immune Response, Evasion Mechanisms, and New Plant-Derived Alternative Therapies. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 1, p. 11, 21 dez. 2022.

HAMILL, R. J. Amphotericin B Formulations: A Comparative Review of Efficacy and Toxicity. **Drugs**, v. 73, n. 9, p. 919–934, jun. 2013.

HELLSTEIN, J. W.; MAREK, C. L. Candidiasis: Red and White Manifestations in the Oral Cavity. **Head and Neck Pathology**, v. 13, n. 1, p. 25–32, 1 mar. 2019.

HOLMES, A. H. et al. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. **The Lancet**, v. 387, n. 10014, p. 176–187, jan. 2016.

HU, L. et al. In vivo effectiveness and safety of probiotics on prophylaxis and treatment of oral candidiasis: a systematic review and meta-analysis. **BMC Oral Health**, v. 19, n. 1, p. 140, dez. 2019.

HUANG, F.-C.; HUANG, S.-C. The Combined Beneficial Effects of Postbiotic Butyrate on Active Vitamin D3-Orchestrated Innate Immunity to Salmonella Colitis. **Biomedicines**, v. 9, n. 10, p. 1296, 22 set. 2021.

IACG. **No Time To Wait: Securing The Future From Drug-Resistant Infections**. Disponível em: <<https://www.who.int/docs/default-source/documents/no-time-to-wait-securing-the-future-from-drug-resistant-infections-en.pdf>>.

JL, J. et al. Microbial metabolite butyrate facilitates M2 macrophage polarization and function. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 24838, 20 abr. 2016.

JIANG, Q. et al. Inhibitory activity *in vitro* of probiotic lactobacilli against oral *Candida* under different fermentation conditions. **Beneficial Microbes**, v. 6, n. 3, p. 361–368, 1 jan. 2015.

JØRGENSEN, M. et al. *Lactobacillus rhamnosus* strains of oral and vaginal origin show strong antifungal activity *in vitro*. **Journal of Oral Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 1832832, 1 jan. 2020.

KAŹMIERCZAK-SIEDLECKA, K. et al. Sodium butyrate in both prevention and supportive treatment of colorectal cancer. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 1023806, 26 out. 2022.

KONG, Q. et al. Minocycline and Fluconazole Have a Synergistic Effect Against *Cryptococcus neoformans* Both *in vitro* and *in vivo*. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 836, 5 maio 2020.

KWON-CHUNG, K. J. et al. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the Etiologic Agents of Cryptococcosis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 4, n. 7, p. a019760–a019760, 1 jul. 2014.

LEMKE, A.; KIDERLEN, A. F.; KAYSER, O. Amphotericin B. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, n. 2, p. 151–162, ago. 2005.

LIN, X. *Cryptococcus neoformans*: Morphogenesis, infection, and evolution. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 4, p. 401–416, jul. 2009.

- MACALPINE, J. et al. A small molecule produced by *Lactobacillus* species blocks *Candida albicans* filamentation by inhibiting a DYRK1-family kinase. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 6151, 22 out. 2021.
- MANZOOR, A. et al. Efficacy of Locally Isolated Lactic Acid Bacteria Against Antibiotic-Resistant Uropathogens. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 9, n. 1, 16 jan. 2016.
- MARTIN LOPEZ, J. E. Candidiasis (vulvovaginal). **BMJ clinical evidence**, v. 2015, p. 0815, 16 mar. 2015.
- MARTYNIK, A. et al. Prebiotics, Probiotics, Synbiotics, Paraprobiotics and Postbiotic Compounds in IBD. **Biomolecules**, v. 11, n. 12, p. 1903, 18 dez. 2021.
- MAZZIOTTA, C. et al. Probiotics Mechanism of Action on Immune Cells and Beneficial Effects on Human Health. **Cells**, v. 12, n. 1, p. 184, 2 jan. 2023.
- MCKLOUD, E. et al. Recurrent Vulvovaginal Candidiasis: a Dynamic Interkingdom Biofilm Disease of *Candida* and *Lactobacillus*. **mSystems**, v. 6, n. 4, p. e00622-21, 31 ago. 2021.
- MORAIS, J. A. V. et al. Photodynamic therapy inhibits cell growth and enhances the histone deacetylase-mediated viability impairment in *Cryptococcus* spp. in vitro. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 29, p. 101583, mar. 2020.
- MORNIROLI, D. et al. Postbiotic Supplementation for Children and Newborn's Health. **Nutrients**, v. 13, n. 3, p. 781, 27 fev. 2021.
- MUNDULA, T. et al. Effect of Probiotics on Oral Candidiasis: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Nutrients**, v. 11, n. 10, p. 2449, 14 out. 2019.
- MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiology Spectrum**, v. 4, n. 2, p. 4.2.15, 25 mar. 2016.
- NGUYEN, L. N. et al. Sodium butyrate inhibits pathogenic yeast growth and enhances the functions of macrophages. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 11, p. 2573–2580, 1 nov. 2011a.
- NGUYEN, L. N. et al. Sodium butyrate inhibits pathogenic yeast growth and enhances the functions of macrophages. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 11, p. 2573–2580, 1 nov. 2011b.
- NOCUA-BÁEZ, L. C. et al. Azoles de antes y ahora: una revisión. **Revista chilena de infectología**, v. 37, n. 3, p. 219–230, jun. 2020.
- OLIVEIRA, L. DE C. **Efeito de Drogas Moduladoras da estrutura da cromatina sobre a interação entre Macrófagos Murinos e Paracoccidioides brasiliensis**. [s.l: s.n.].
- OLIVEIRA, L. V. N. D. et al. In vivo probiotic and antimicrobial photodynamic therapy as alternative therapies against cryptococcosis are ineffective. **Veterinary Microbiology**, v. 211, p. 169–173, nov. 2017.

ONCEL, M. Y. et al. Comparison of *Lactobacillus reuteri* and nystatin prophylaxis on *Candida* colonization and infection in very low birth weight infants. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, v. 28, n. 15, p. 1790–1794, 13 out. 2015.

PAIS, P. et al. *Candida glabrata* Transcription Factor Rpn4 Mediates Fluconazole Resistance through Regulation of Ergosterol Biosynthesis and Plasma Membrane Permeability. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 9, p. e00554-20, 20 ago. 2020.

PALADINE, H. L.; DESAI, U. A. Vaginitis: Diagnosis and Treatment. **American Family Physician**, v. 97, n. 5, p. 321–329, 1 mar. 2018.

PANIÁGUA, A. L. et al. Inhibitory effects of *Lactobacillus casei* Shirota against both *Candida auris* and *Candida* spp. isolates that cause vulvovaginal candidiasis and are resistant to antifungals. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 21, n. 1, p. 237, dez. 2021.

PANPETCH, W. et al. Additional *Candida albicans* administration enhances the severity of dextran sulfate solution induced colitis mouse model through leaky gut-enhanced systemic inflammation and gut-dysbiosis but attenuated by *Lactobacillus rhamnosus* L34. **Gut Microbes**, v. 11, n. 3, p. 465–480, 3 maio 2020.

PAUL, S.; DOERING, T. L.; MOYE-ROWLEY, W. S. *Cryptococcus neoformans* Yap1 is required for normal fluconazole and oxidative stress resistance. **Fungal Genetics and Biology**, v. 74, p. 1–9, jan. 2015.

PENG, C. A. et al. Fluconazole induces ROS in *Cryptococcus neoformans* and contributes to DNA damage in vitro. **PLOS ONE**, v. 13, n. 12, p. e0208471, 7 dez. 2018.

PERICOLINI, E. et al. Therapeutic activity of a *Saccharomyces cerevisiae* -based probiotic and inactivated whole yeast on vaginal candidiasis. **Virulence**, v. 8, n. 1, p. 74–90, 2 jan. 2017.

PITHVA, S. et al. Probiotic Attributes of Autochthonous *Lactobacillus rhamnosus* Strains of Human Origin. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 173, n. 1, p. 259–277, maio 2014.

PRISTOV, K. E.; GHANNOUM, M. A. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 7, p. 792–798, jul. 2019.

QIU, X. et al. Changes in the composition of intestinal fungi and their role in mice with dextran sulfate sodium-induced colitis. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 10416, 27 maio 2015.

QUIGLEY, E. M. M. Prebiotics and Probiotics in Digestive Health. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 17, n. 2, p. 333–344, jan. 2019.

QUINDOS, G. et al. Therapeutic tools for oral candidiasis: Current and new antifungal drugs. **Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal**, p. 0–0, 2019.

RANJAN, K. et al. The role of *Cryptococcus neoformans* histone deacetylase genes in the response to antifungal drugs, epigenetic modulators and to photodynamic therapy mediated by an aluminium phthalocyanine chloride nanoemulsion in vitro. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 216, p. 112131, mar. 2021.

ROCHA-RAMÍREZ, L. M. et al. Probiotic *Lactobacillus* Strains Stimulate the Inflammatory Response and Activate Human Macrophages. **Journal of Immunology Research**, v. 2017, p. 1–14, 2017.

RODRIGUES, C. et al. Candida glabrata Biofilms: How Far Have We Come? **Journal of Fungi**, v. 3, n. 1, p. 11, 1 mar. 2017.

RODRÍGUEZ-CERDEIRA, C. et al. Pathogenesis and Clinical Relevance of Candida Biofilms in Vulvovaginal Candidiasis. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 544480, 11 nov. 2020.

ROY, S.; DHANESHWAR, S. Role of prebiotics, probiotics, and synbiotics in management of inflammatory bowel disease: Current perspectives. **World Journal of Gastroenterology**, v. 29, n. 14, p. 2078–2100, 14 abr. 2023.

SAMARASINGHE, H.; XU, J. Hybrids and hybridization in the *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* species complexes. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 66, p. 245–255, dez. 2018.

SANTOS, A. L. D. et al. Influence of probiotics on Candida presence and IgA anti-Candida in the oral cavity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 960–964, dez. 2009.

SCHLUTER, D. Ecology and the origin of species. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 16, n. 7, p. 372–380, jul. 2001.

SEGERS, M. E.; LEBEER, S. Towards a better understanding of *Lactobacillus rhamnosus* GG-host interactions. **Microbial Cell Factories**, v. 13 Suppl 1, n. Suppl 1, p. S7, 29 ago. 2014.

SILVA, H. S. DA. **Ação inibitória de *Lactobacillus reuteri* na microbiota de camarão (*Litopenaeus vannamei*) refrigerado.** [s.l: s.n.].

SMITH, W. L.; EDLIND, T. D. Histone Deacetylase Inhibitors Enhance *Candida albicans* Sensitivity to Azoles and Related Antifungals: Correlation with Reduction in *CDR* and *ERG* Upregulation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 11, p. 3532–3539, nov. 2002.

SONG, Y.-G.; LEE, S.-H. Inhibitory effects of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus casei* on Candida biofilm of denture surface. **Archives of Oral Biology**, v. 76, p. 1–6, abr. 2017.

SPAGGIARI, L. et al. *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, and *L. reuteri* Cell-Free Supernatants Inhibit Candida parapsilosis Pathogenic Potential upon Infection of Vaginal Epithelial Cells Monolayer and in a Transwell Coculture System *In Vitro*. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 3, p. e02696-21, 29 jun. 2022.

SPINLER, J. K. et al. Human-derived probiotic *Lactobacillus reuteri* demonstrate antimicrobial activities targeting diverse enteric bacterial pathogens. **Anaerobe**, v. 14, n. 3, p. 166–171, jun. 2008.

STIVALA, A. et al. *Lactobacillus rhamnosus* AD3 as a Promising Alternative for Probiotic Products. **Biomolecules**, v. 11, n. 1, p. 94, 13 jan. 2021.

SUTULA, J. et al. The effect of a commercial probiotic drink containing *Lactobacillus casei* strain Shirota on oral health in healthy dentate people. **Microbial Ecology in Health & Disease**, v. 24, n. 0, 29 out. 2013.

TIMMERMANS, B. et al. Adhesins in *Candida glabrata*. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 2, p. 60, 20 maio 2018.

VAN DER WEERDEN, N. L.; BLEACKLEY, M. R.; ANDERSON, M. A. Properties and mechanisms of action of naturally occurring antifungal peptides. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 70, n. 19, p. 3545–3570, out. 2013.

VERMES, A. Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, n. 2, p. 171–179, 1 ago. 2000.

VILLENA, J. et al. Immunomodulatory and protective effect of probiotic *Lactobacillus casei* against *Candida albicans* infection in malnourished mice: J. Villena et al. **Microbiology and Immunology**, v. 55, n. 6, p. 434–445, jun. 2011.

VINDEROLA, G. et al. Frequently asked questions about the ISAPP postbiotic definition. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, p. 1324565, 10 jan. 2024.

VINDEROLA, G.; SANDERS, M. E.; SALMINEN, S. The Concept of Postbiotics. **Foods**, v. 11, n. 8, p. 1077, 8 abr. 2022.

VIVIANI, M. A. Flucytosine—what is its future? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 35, n. 2, p. 241–244, 1995.

WALL, G. et al. *Candida albicans* biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis. **Current Opinion in Microbiology**, v. 52, p. 1–6, dez. 2019.

WANG, F. et al. Interactions between invasive fungi and symbiotic bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 9, p. 137, set. 2020.

WHO. **WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action**, 2022. Disponível em:

<<https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/363682/9789240060241-eng.pdf?sequence=1>>.

Acesso em: 22 nov. 2023

XIE, H. Y. et al. Probiotics for vulvovaginal candidiasis in non-pregnant women. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2017, n. 11, 23 nov. 2017.

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

ZAKRZEWSKA, Z. et al. Prebiotics, Probiotics, and Postbiotics in the Prevention and Treatment of Anemia. **Microorganisms**, v. 10, n. 7, p. 1330, 30 jun. 2022.

ZANGL, I. et al. The role of *Lactobacillus* species in the control of *Candida* via biotrophic interactions. **Microbial Cell**, v. 7, n. 1, p. 1–14, 6 jan. 2020.

ZARAGOZA, O. Basic principles of the virulence of *Cryptococcus*. **Virulence**, v. 10, n. 1, p. 490–501, 1 jan. 2019.

ZAVISIC, G. et al. Probiotic features of two oral *Lactobacillus* isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 418–428, jan. 2012.

ZHAO, C. et al. *In vitro* inhibitory activity of probiotic products against oral *Candida* species. **Journal of Applied Microbiology**, v. 121, n. 1, p. 254–262, jul. 2016.

ZHAO, Y.; LIN, X. *Cryptococcus neoformans*: Sex, morphogenesis, and virulence. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 89, p. 104731, abr. 2021.

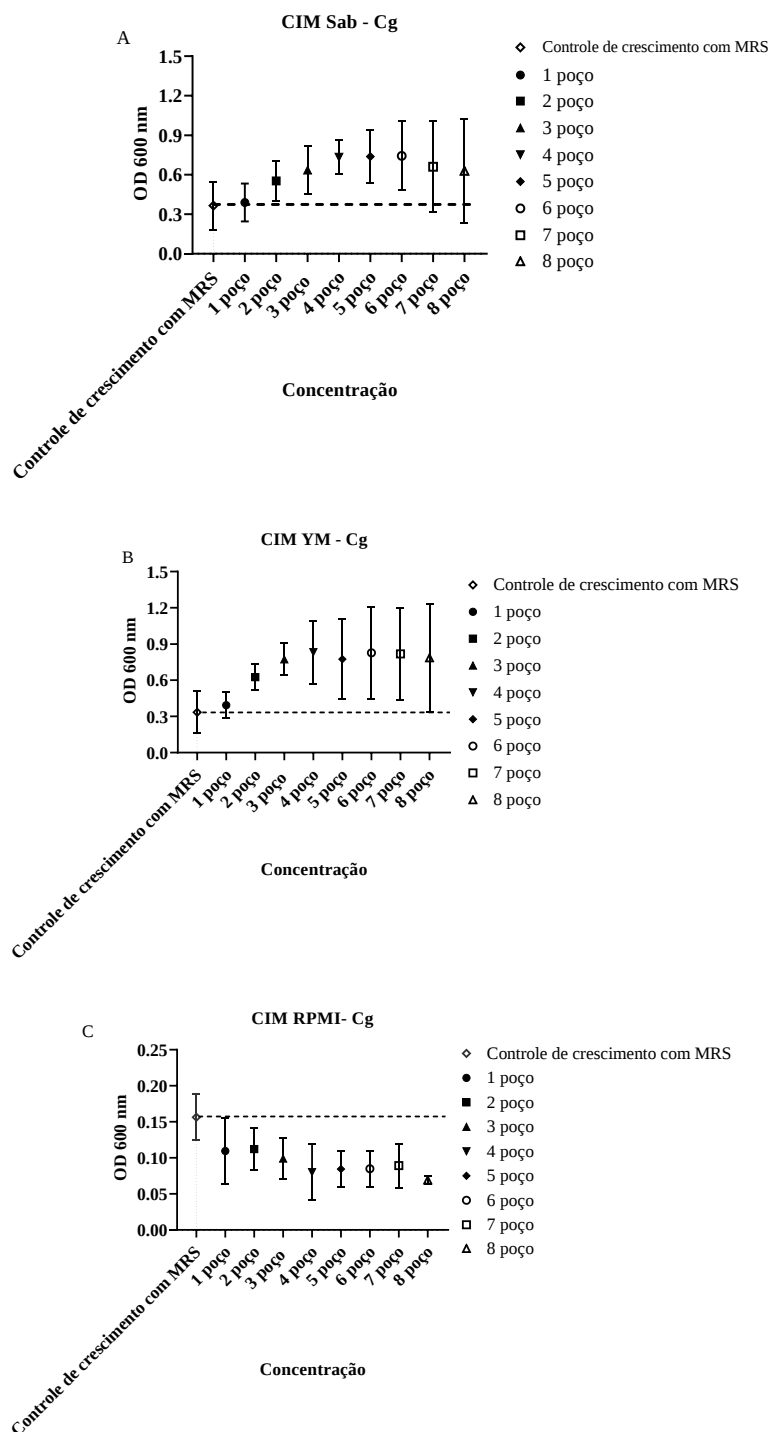
ZHOU, Z. et al. Sodium butyrate attenuated neuronal apoptosis via GPR41/G $\beta\gamma$ /PI3K/Akt pathway after MCAO in rats. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 41, n. 2, p. 267–281, fev. 2021.

ŻÓŁKIEWICZ, J. et al. Postbiotics—A Step Beyond Pre- and Probiotics. **Nutrients**, v. 12, n. 8, p. 2189, 23 jul. 2020.

11. Apêndice

Análise do Desvio padrão do pós-biótico de *L. casei* contra *C. glabrata*

Figura 19 - Análise do Desvio-padrão do efeito dose-dependente do pós-biótico de *L. casei* sobre o crescimento de *C. glabrata*

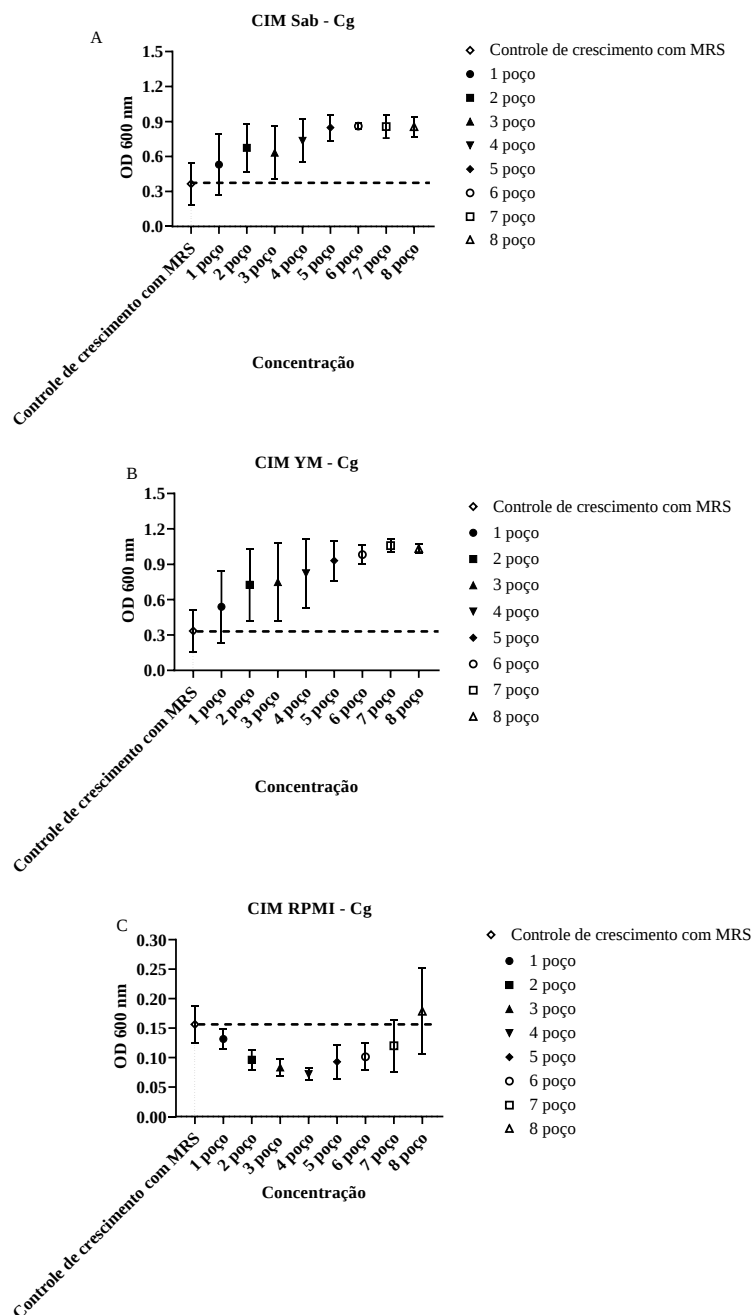


Legenda: A análise foi realizada no intervalo de crescimento de 24 horas. O eixo Y indica a densidade óptica (600 nm), o eixo X indica os 1-8 poço com as concentrações seriadas dos compostos analisados (1 = [50%]; 2 = [25%]; 3 = [12.5%]; 4 = [6.25%]; 5 = [3.12%]; 6 = [1.56%]; 7 = [0.78%]; 8 = 0.39%) da placa mais o controle de crescimento. Na linha preta traçada é a média do controle de crescimento que contém o meio de cultivo (RPMI,

Sab ou YM) mais o MRS e *C. glabrata*. No eixo X, os gráficos apresentam o desvio padrão, no qual, os poços de 1-8 são os resultados das placas de CIM. As figuras são a representação de triplicata biológica com dados similares

Análise do Desvio-padrão do pós-biótico de *L. casei* Shiota contra *C. glabrata*

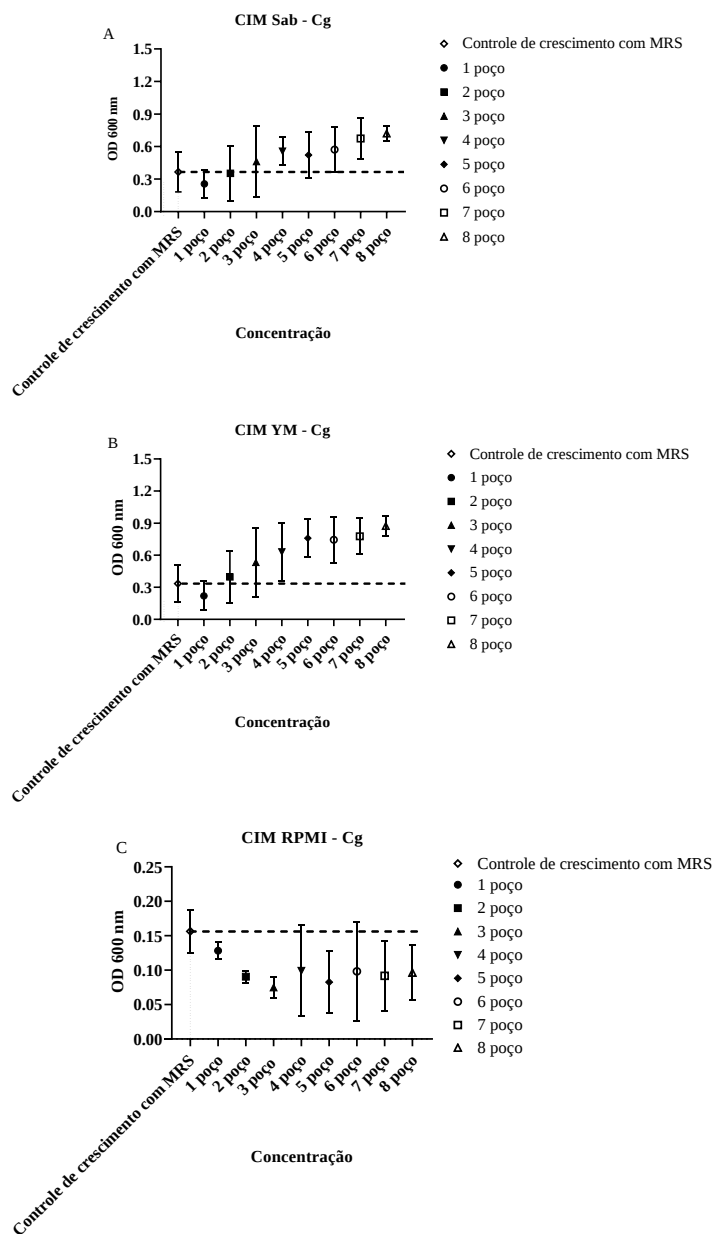
Figura 20 – Análise do Desvio-padrão do efeito dose-dependente do pós-biótico de *L. casei* Shiota sobre o crescimento de *C. glabrata*



Legenda: A análise foi realizada no intervalo de crescimento de 24 horas. O eixo Y indica a densidade óptica (600 nm), o eixo X indica os 1-8 poço com as concentrações seriadas dos compostos analisados (1 = [50%]; 2 = [25%]; 3 = [12.5%]; 4 = [6.25%]; 5 = [3.12%]; 6 = [1.56%]; 7 = [0.78%]; 8 = 0.39%) da placa mais o controle de crescimento. Na linha preta traçada é a média do controle de crescimento que contém o meio de cultivo (RPMI, Sab ou YM) mais o MRS e *C. glabrata*. No eixo X, os gráficos apresentam o desvio padrão, no qual, os poços de 1-8 são os resultados das placas de CIM. As figuras são a representação de triplicata biológica com dados similares

Análise do Desvio-padrão do pós-biótico de *L. reuteri* contra *C. glabrata*

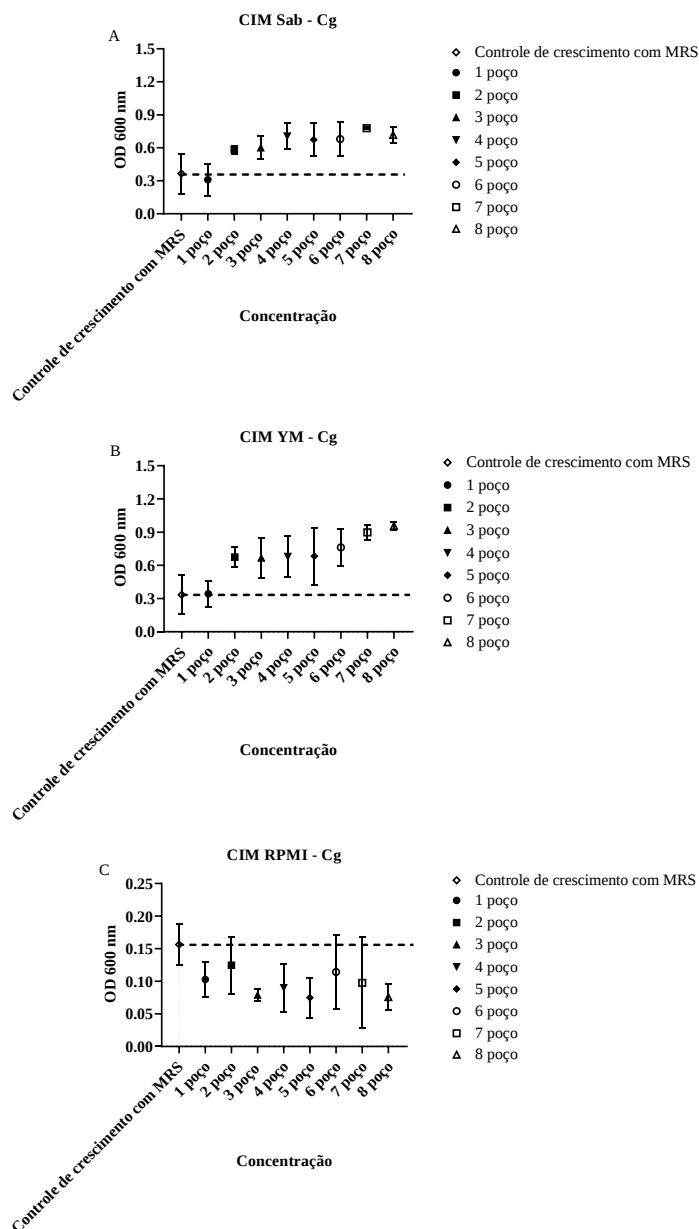
Figura 21: Análise do Desvio-padrão do efeito dose-dependente do pós-biótico de *L. reuteri* sobre o crescimento de *C. glabrata*



Legenda: A análise foi realizada no intervalo de crescimento de 24 horas. O eixo Y indica a densidade óptica (600 nm), o eixo X indica os 1-8 poço com a concentrações seriadas dos compostos analisados (1 = [50%]; 2 = [25%]; 3 = [12.5%]; 4 = [6.25%]; 5 = [3.12%]; 6 = [1.56%]; 7 = [0.78%]; 8 = 0.39%) da placa mais o controle de crescimento. Na linha preta traçada é a média do controle de crescimento que contem o meio de cultivo (RPMI, Sab ou YM) mais o MRS e *C. glabrata*. No eixo X, os gráficos apresentam o desvio padrão, no qual, os poços de 1-8 são os resultados das placas de CIM. As figuras são a representação de triplicata biológica com dados similares

Análise do Desvio-padrão do pós-biótico de *L. rhamnosus* contra *C. glabrata*

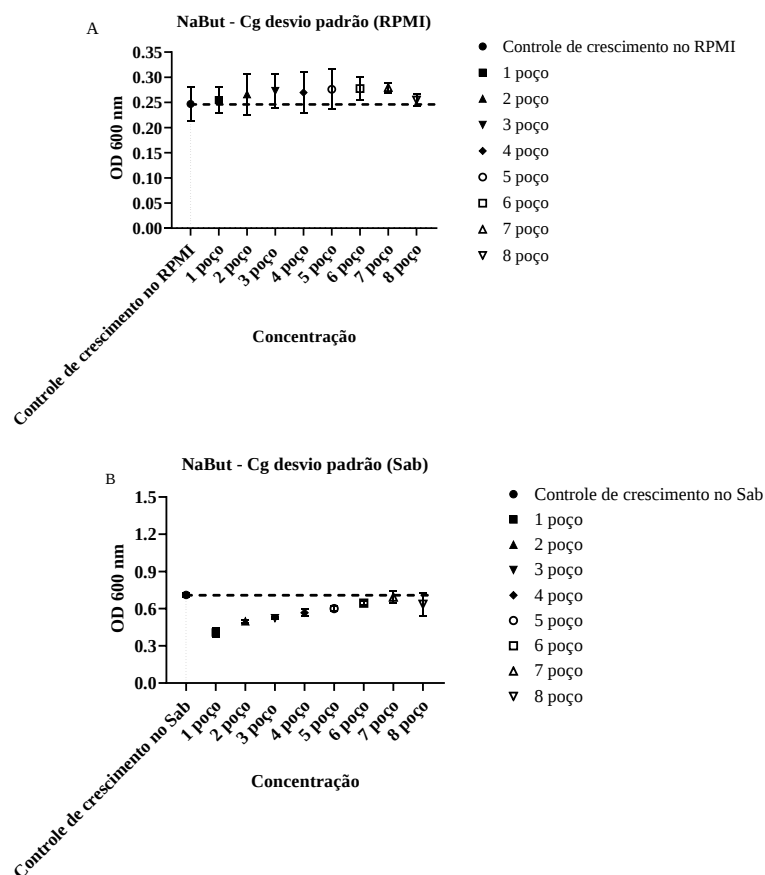
Figura 22 - Análise do Desvio-padrão do efeito dose-dependente do pós-biótico de *L. rhamnosus* sobre o crescimento de *C. glabrata*



Legenda: A análise foi realizada no intervalo de crescimento de 24 horas. O eixo Y indica a densidade óptica (600 nm), o eixo X indica os 1-8 poço com as concentrações seriadas dos compostos analisados (1 = [50%]; 2 = [25%]; 3 = [12.5%]; 4 = [6.25%]; 5 = [3.12%]; 6 = [1.56%]; 7 = [0.78%]; 8 = 0.39%) da placa mais o controle de crescimento. Na linha preta traçada é a média do controle de crescimento que contém o meio de cultivo (RPMI, Sab ou YM) mais o MRS e *C. glabrata*. No eixo X os gráficos apresentam o desvio padrão, no qual, os poços de 1-8 são os resultados das placas de CIM. As figuras são a representação de triplicata biológica com dados similares

Análise do Desvio-padrão de NaBut contra *C. glabrata*

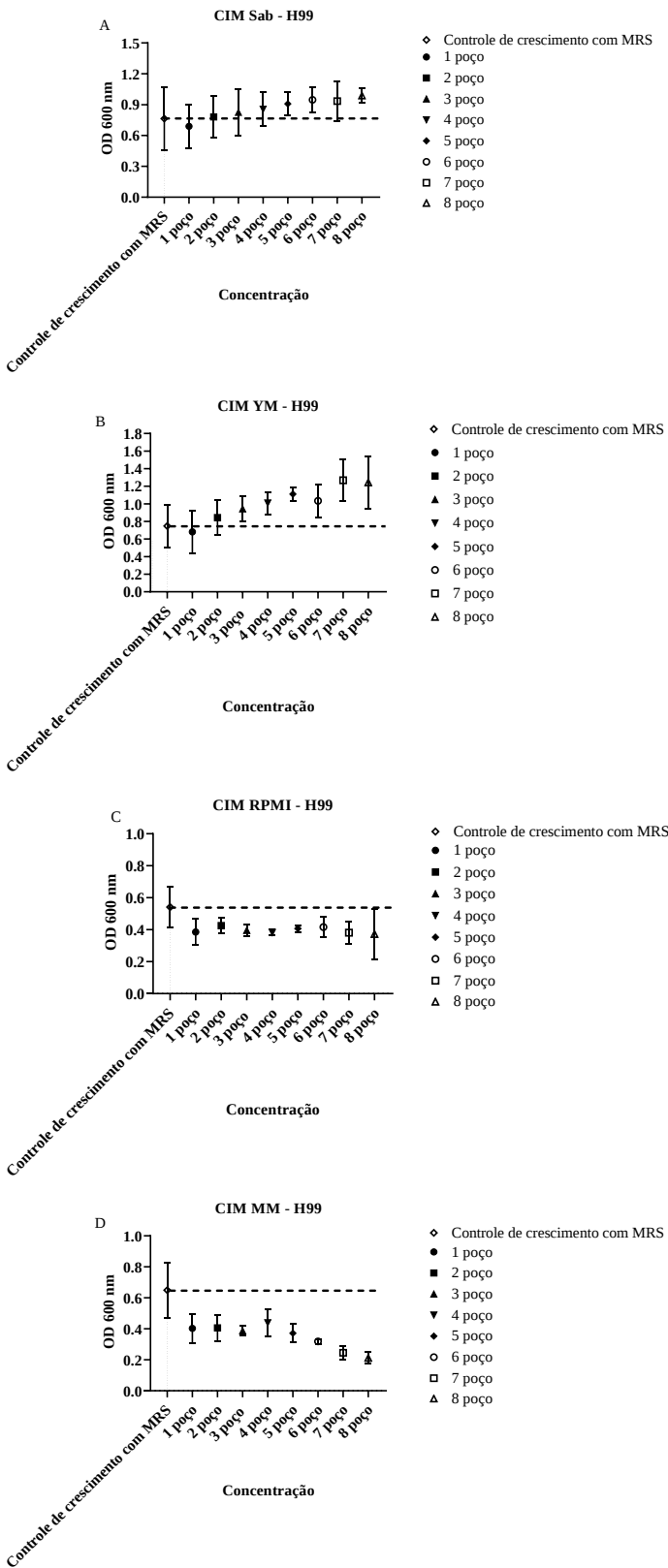
Figura 23: Análise do Desvio-padrão do efeito dose-dependente de NaBut sobre o crescimento de *C. glabrata*



Legenda: A análise foi realizada no intervalo de crescimento de 24 horas. O eixo Y representa a densidade óptica (OD 600 nm), o eixo X indica os 1-8 poço que representa as concentrações seriadas de NaBut (1 = [55 mM], 2 = [27,5 mM], 3 = [13,75 mM], 4 = [6,875 mM], 5 = [3,437 mM], 6 = [1,718 mM], 7 = [0,859 mM] e 8 = [0,429 mM]) da placa mais o controle positivo. Na linha preta traçada é a média do controle de crescimento, em que apenas *C. glabrata* e os meios de cultura, RPMI ou Sabouraud (Sab). No eixo X, os gráficos apresentam o desvio padrão, no qual, os poços de 1-8 são os resultados das placas de CIM. As figuras são a representação de triplicata biológica com dados similares.

Análise do Desvio-padrão do pós-biótico de *L. casei* contra *C. neoformans* (H99)

Figura 24: Análise do Desvio-padrão do efeito dose-dependente do pós-biótico de *L. casei* sobre o crescimento de *C. neoformans* (H99)

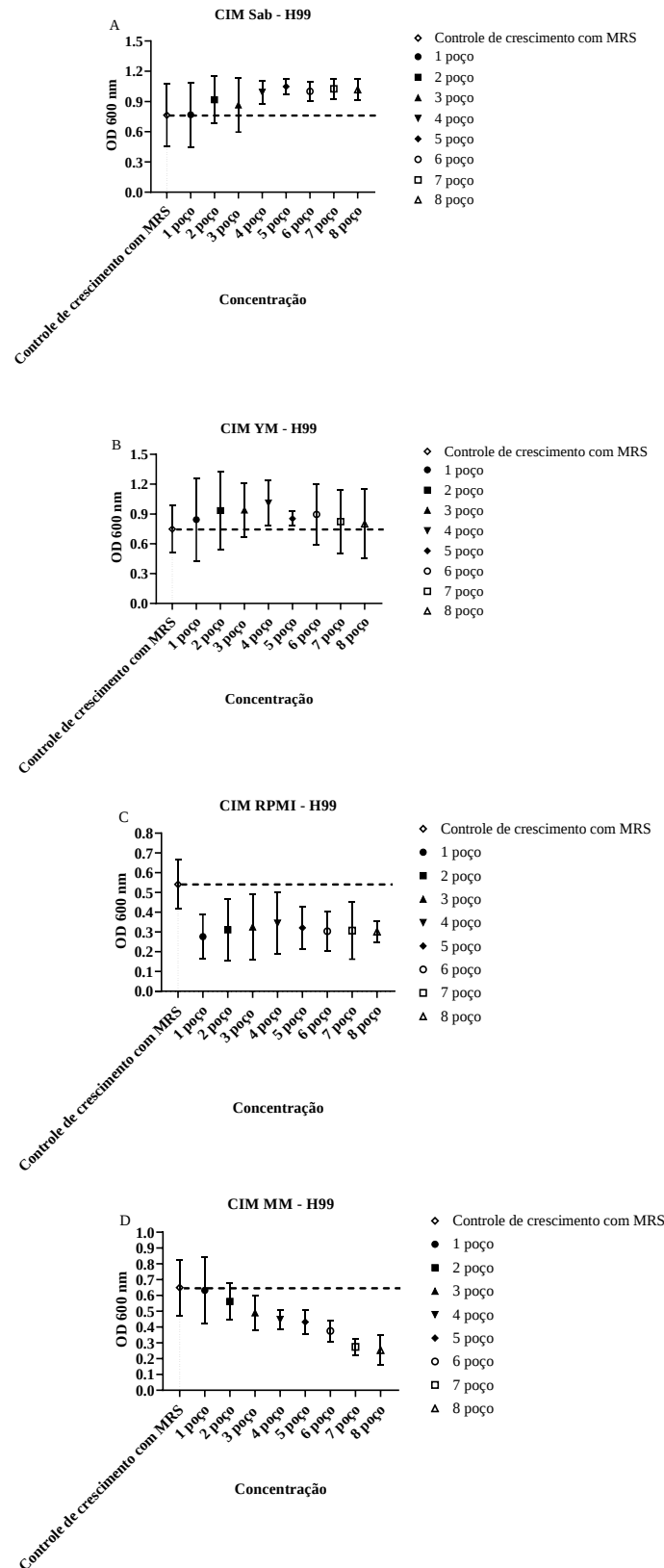


Legenda: A análise foi realizada no intervalo de crescimento de 24 horas. O eixo Y indica a densidade óptica (600 nm), o eixo X indica os 1-8 poço com as concentrações seriadas dos compostos analisados (1 = [50%]; 2 = [25%];

3 = [12.5%]; 4 = [6.25%]; 5 = [3.12%]; 6 = [1.56%]; 7 = [0.78%]; 8 = 0.39%] da placa mais o controle de crescimento. Na linha preta traçada é a média do controle de crescimento que contem o meio de cultivo (RPMI, Sab, YM ou MM) mais o MRS e *C. neoformans*. No eixo X, os gráficos apresentam o desvio padrão, no qual, os poços de 1-8 são os resultados das placas de CIM. As figuras são a representação de triplicata biológica com dados similares

Análise do Desvio-padrão do pós-biótico de *L. casei* Shirota contra *C. neoformans* (H99)

Figura 25 - Análise do Desvio-padrão do efeito dose-dependente do pós-biótico de *L. casei* Shirota sobre o crescimento de *C. neoformans* (H99)

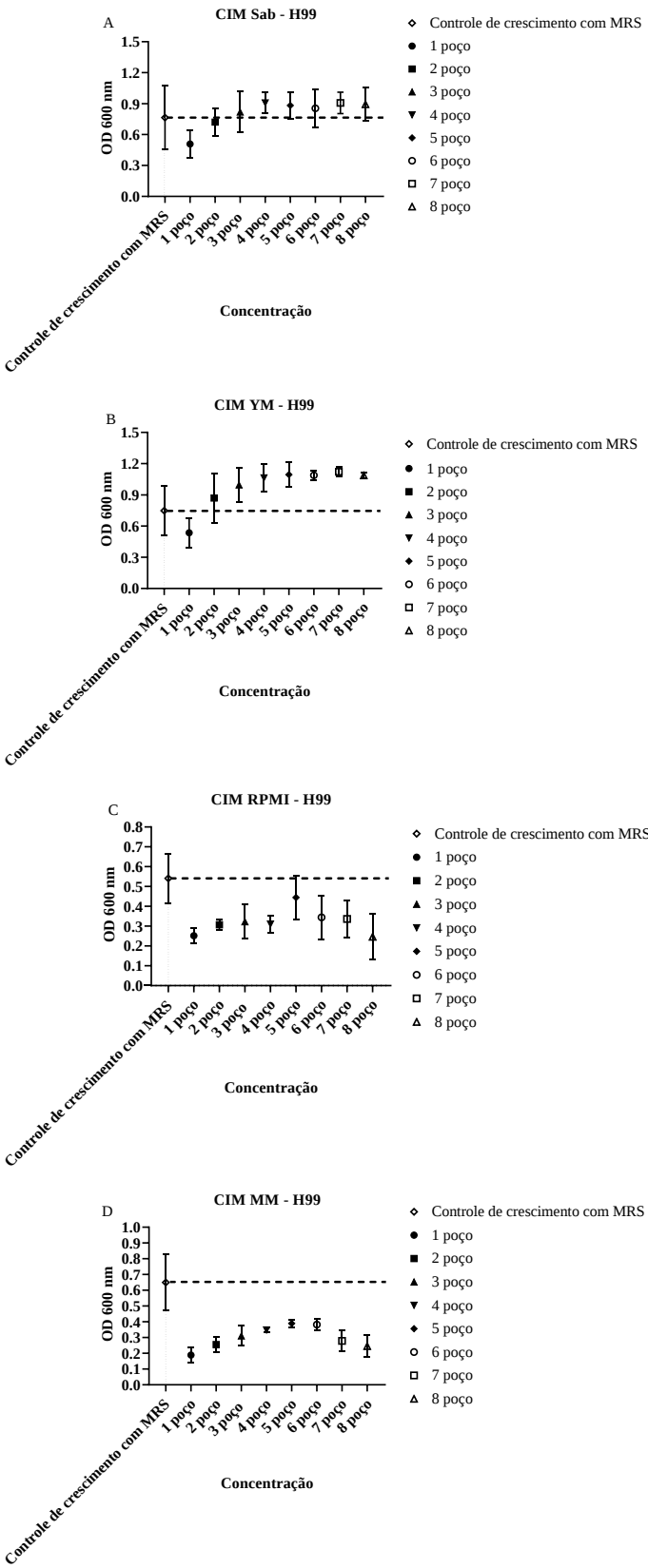


Legenda: A análise foi realizada no intervalo de crescimento de 24 horas. O eixo Y indica a densidade óptica (600 nm), o eixo X indica os 1-8 poço com as concentrações seriadas dos compostos analisados (1 = [50%]; 2 = [25%];

3 = [12.5%]; 4 = [6.25%]; 5 = [3.12%]; 6 = [1.56%]; 7 = [0.78%]; 8 = 0.39%] da placa mais o controle de crescimento. Na linha preta traçada é a média do controle de crescimento que contem o meio de cultivo (RPMI, Sab, YM ou MM) mais o MRS e *C. neoformans*. No eixo X, os gráficos apresentam o desvio padrão, no qual, os poços de 1-8 são os resultados das placas de CIM. As figuras são a representação de triplicata biológica com dados similares

Análise do Desvio-padrão do pós-biótico de *L. reuteri* contra *C. neoformans* (H99)

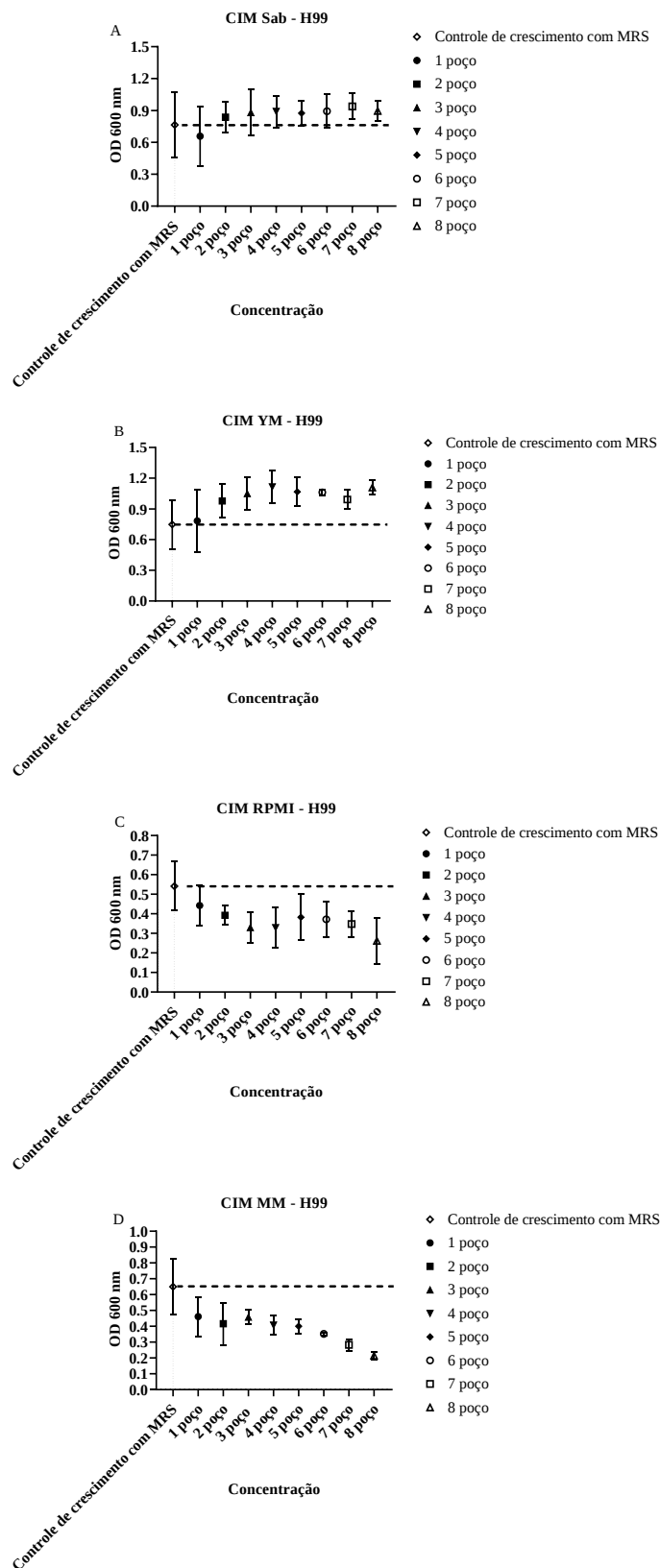
Figura 26 - Análise do Desvio-padrão do efeito dose-dependente do pós-biótico de *L. reuteri* sobre o crescimento de *C. neoformans* (H99)



Legenda: A análise foi realizada no intervalo de crescimento de 24 horas. O eixo Y indica a densidade óptica (600 nm), o eixo X indica os 1-8 poço com a concentrações seriadas dos compostos analisados (1 = [50%]; 2 = [25%]; 3 = [12.5%]; 4 = [6.25%]; 5 = [3.12%]; 6 = [1.56%]; 7 = [0.78%]; 8 = 0.39%] da placa mais o controle de crescimento. Na linha preta traçada é a média do controle de crescimento que contem o meio de cultivo (RPMI, Sab, YM ou MM) mais o MRS e *C. neoformans*. No eixo X, os gráficos apresentam o desvio padrão, no qual, os poços de 1-8 são os resultados das placas de CIM. As figuras são a representação de triplicata biológica com dados similares

Análise do Desvio-padrão do pós-biótico de *L. rhamnosus* contra *C. neoformans* (H99)

Figura 27 - Análise do Desvio-padrão do efeito dose-dependente do pós-biótico de *L. rhamnosus* sobre o crescimento de *C. neoformans* (H99)

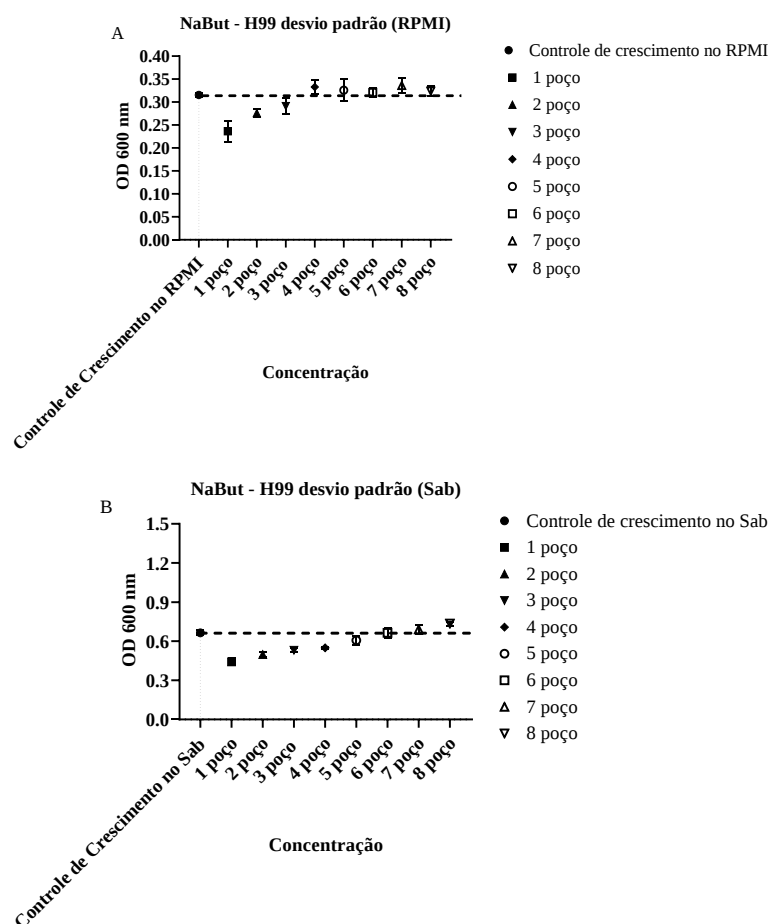


Legenda: A análise foi realizada no intervalo de crescimento de 24 horas. O eixo Y indica a densidade óptica (600 nm), o eixo X indica os 1-8 poço com as concentrações seriadas dos compostos analisados (1 = [50%]; 2 = [25%];

3 = [12.5%]; 4 = [6.25%]; 5 = [3.12%]; 6 = [1.56%]; 7 = [0.78%]; 8 = 0.39%] da placa mais o controle de crescimento. Na linha preta traçada é a média do controle de crescimento que contem o meio de cultivo (RPMI, Sab, YM ou MM) mais o MRS e *C. neoformans*. No eixo X, os gráficos apresentam o desvio padrão, no qual, os poços de 1-8 são os resultados das placas de CIM. As figuras são a representação de triplicata biológica com dados similares

Análise do Desvio-padrão de NaBut contra *C. neoformans*

Figura 28 - Desvio padrão do efeito dose-dependente de NaBut sobre o crescimento de *C. neoformans*



Legenda: A análise foi realizada no intervalo de crescimento de 24 horas. O eixo Y representa a densidade óptica (OD 600 nm), o eixo X indica os 1-8 poço que representa as concentrações seriadas de NaBut (1 = [55 mM], 2 = [27,5 mM], 3 = [13,75 mM], 4 = [6,875 mM], 5 = [3,437 mM], 6 = [1,718 mM], 7 = [0,859 mM] e 8 = [0,429 mM]) da placa mais o controle de crescimento. Na linha preta traçada é a média do controle de crescimento, em que apenas *C. neoformans* e os meios de cultura, RPMI ou Sabouraud (Sab). No eixo X, os gráficos apresentam o desvio padrão, no qual, os poços de 1-8 são os resultados das placas de CIM. As figuras são a representação de duplicatas biológica com dados similares