



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DE SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA

NATÁLIA LOPES DE FREITAS

**EXCRETAS METABÓLICAS DE *Lactobacillus* spp. E BUTIRATO DE SÓDIO:
POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO NO COMBATE À CANDIDÍASE.**

*Metabolic Excrete of *Lactobacillus* spp. and Sodium Butyrate: Biotechnological Potential
in Fighting Candidiasis.*

Brasília - DF

2021

Natália Lopes de Freitas

**EXCRETAS METABÓLICAS DE *Lactobacillus* spp. E BUTIRATO DE SÓDIO:
POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO NO COMBATE À CANDIDÍASE.**

*Metabolic Excrete of Lactobacillus spp. and Sodium Butyrate: Biotechnological Potential
in Fighting Candidiasis.*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências da Saúde, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Brandão Alves Silva.

Brasília - DF

2021

Natália Lopes de Freitas

**SOBRENADANTE DE *Lactobacillus* spp. E BUTIRATO DE SÓDIO: SEU
POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO NO COMBATE À CANDIDÍASE**

*Metabolic Excrete of Lactobacillus spp. and Sodium Butyrate: Biotechnological Potential
in Fighting Candidiasis.*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências da Saúde, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Bacharel em Farmácia.

Aprovado em 01 de novembro de 2021.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Fabiana Brandão Alves Silva (UnB) - Presidente

Tanise V. Dalmolin

Profa. Dra. Tanise Vendruscolo Dalmolin (UnB)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à Deus pela proteção, por estar comigo todos os dias, por todas as bênçãos e pela força para cada dia superar as minhas dificuldades e fazer o meu melhor.

À minha orientadora, Profa. Dra. Fabiana Brandão Alves Silva, que segurou a minha mão e percorreu todo esse caminho, com orientações para a escolha do meu tema, pelas contribuições teóricas e técnica, pelos ensinamentos sobre a vida e por sempre me motivar a fazer mais e mais ...

À Dra. Rosane Mansan, pelas contribuições técnicas e pela parceria na rotina do laboratório.

Às amigas, Emília, Jaya e Rayssa, pela parceria na rotina do laboratório, nos desesperos e emoções durante os experimentos.

À Universidade de Brasília, por ter me recebido nesse caminho e ter me proporcionado vivências únicas, ensino gratuito e de excelência.

Ao Departamento de Farmácia e ao corpo docente do curso de Farmácia, pelo apoio durante essa jornada acadêmica.

À minha família, que entenderam as minhas muitas ausências e sempre torceram, riram, choraram e rezaram comigo e por mim, sempre se mantendo presentes e dando todo apoio e suporte.

Ao meu namorado, por sempre me apoiar em todas as minhas ideias e me dar forças para continuar.

A todos os amigos pelo carinho, paciência, apoio, motivação e parceria em todas as etapas.

Não tenho palavras para agradecer a todos!

“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes.”

Isaac Newton

RESUMO

Candida spp. são as leveduras prevalentes envolvidas em infecções fúngicas, sobretudo em pacientes imunocomprometidos, aumentando a morbimortalidade. Desde o alerta da OMS acerca da escassez de antimicrobianos e o crescente número de micro-organismos multirresistentes, se faz necessário avaliar as possíveis hipóteses de tratamento. Visto que a *Candida* spp. já desenvolveu diversos mecanismos de resistência aos principais antifúngicos utilizados no seu tratamento. Dessa forma, especula-se acerca de tratamentos adjuvantes para a candidíase, como o uso de Butirato de Sódio, inibidor de Histona Deacetilase, que estudos o indicam como características limitar o crescimento fúngico, a virulência, a formação de biofilmes e a disseminação no hospedeiro. Outra hipótese é a partir do uso de probióticos, como o *L. casei* Shirota, presente no Yakult, que estudos o indicam características de potencial antifúngico, pela liberação de metabólitos no sobrenadante de seu meio de cultivo. Por meio de ensaio de microdiluição em caldo e análise de ação fungicida por meio de ensaio de Unidades Formadoras de Colônia, com breakpoint de fluconazol e concentrações variadas de Butirato de Sódio e sobrenadante da cultura de *L. casei* Shirota. Apresentando resultados positivos e animadores, com a redução significativa do crescimento *C. albicans* e *C. glabrata* quando com Butirato de Sódio e sobrenadante de *L. casei* Shirota e quando juntos apresentou sinergismo com redução do crescimento fúngico semelhante ao uso de fluconazol. Logo, abrindo novas possibilidades para o tratamento para candidíase vaginal e intestinal, com a vantagem de uma limitada possibilidade de gerar resistência ao tratamento, por resultar na relação desarmônica entre bactérias e leveduras.

Palavra-chave: Butirato de Sódio. *Candida albicans*. *Candida glabrata*. *Lactobacillus casei* Shirota.

ABSTRACT

Candida spp. is the main cause of fungal infections, especially in immunocompromised patients, increasing morbidity and mortality rates. And since the WHO warning about the scarcity of antimicrobials and the growing number of multi-resistant microorganisms, it is necessary to evaluate the possible treatment hypotheses. Since *Candida* spp. has already developed several mechanisms of resistance to the main antifungal agents used in its treatment. Thus, it is speculated about adjuvant treatments for candidiasis, such as the use of Sodium Butyrate, a Histone Deacetylase inhibitor, which studies indicate as characteristics limiting fungal growth, virulence, biofilm formation and host dissemination. Another hypothesis is based on the use of probiotics, such as *L. casei* Shirota, present in Yakult, which studies indicate to have potential antifungal characteristics, through the release of metabolites in the supernatant of their culture medium. By means of microdilution test in broth and analysis of fungicidal action by means of the Colony Forming Units test, with fluconazole breakpoint and varied concentrations of Sodium Butyrate and *L. casei* Shirota culture supernatant. Delivering positive and encouraging results were presented, with a significant reduction in growth of *C. albicans* and *C. glabrata* when using Sodium Butyrate and *L. casei* Shirota supernatant and when together, it presented synergism with reduced fungal growth similar to the use of fluconazole. Therefore, opening new possibilities for the treatment of vaginal and intestinal candidiasis, with the advantage of not generating resistance to the treatment, as it results in the inharmonious relationship between bacteria and yeasts.

Key words: Antifungal Agents. Butyric Acid. *Candida Albicans*. *Candida Glabrata*. *Lactobacillus casei* Shirota.

SUMÁRIOS

1. INTRODUÇÃO	09
1.1 <i>Candida albicans</i>	09
1.2 <i>Candida glabrata</i>	09
1.3 Resistência aos antimicrobianos do mercado.....	10
1.4 Uma porta que abre: pré e pró-bióticos como possibilidade de novas abordagens terapêuticas.....	11
1.4.1 <i>Lactobacillus</i> spp.	12
1.4.2 Butirato de sódio - um prebiótico promissor.....	13
2. METODOLOGIA	14
2.1 <i>Candida</i> spp.	14
2.2 <i>Lactobacillus</i> spp.	14
2.3 Manutenção e cultivo de <i>Candida</i> spp. e <i>Lactobacillus</i> spp.	15
2.4 Reagentes e soluções.....	15
2.5 Microdiluição em caldo - Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	15
2.6 Análise de ação fungicida por meio de ensaio de Unidades Formadoras de Colônia (CFU).....	17
2.7 Gráficos e Estatística.....	18
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
3.1 Avaliação da atividade de NaBut sobre o crescimento de espécies de <i>Candida</i> spp.	19
3.2 Avaliação da atividade do sobrenadante de <i>L. casei</i> Shirota sobre o crescimento de espécies de <i>Candida</i> spp.	22
3.3 Avaliação da atividade do sinergismo entre NaBut, sobrenadante de <i>L. casei</i> Shirota e fluconazol sobre o crescimento de espécies de <i>Candida</i> spp.	29
4. CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS	34
APÊNDICE	43

1. INTRODUÇÃO

Os fungos são micro-organismos em sua maioria saprófitas, com papel essencial ao equilíbrio ecológico que permite a vida no planeta ¹. Contudo, algumas dezenas de espécies são capazes de causar uma diversidade de processos infecciosos em humanos, associados a elevado risco de morbimortalidade ²⁻⁴. Pode-se dizer que os fungos patogênicos apresentam uma adaptação *in vivo* de sucesso durante processos infecciosos, tal fato se deve além dos fatores de virulência, ao crescente perfil de resistência aos tratamentos convencionais ^{5,6}.

À vista disso, a infecção causada por *Candida* spp. está ligada a altos custos referentes ao tratamento e hospitalização dos pacientes e níveis elevados de morte, principalmente em pacientes que se encontram imunossuprimidos, o que aumenta a chance de casos de fungemia ⁷⁻¹⁰.

1.1 *Candida albicans*

A espécie *Candida albicans* é a principal levedura causadora da candidíase, devido aos fatores de virulência, como mecanismos de evasão do sistema imunológico, sua plasticidade morfológica (levedura, pseudo-hifas e hifas), a capacidade de formar biofilme, além da disseminação no ambiente hospitalar ¹¹⁻¹³. Somando os fatores supracitados, *C. albicans* é parte da microbiota dos indivíduos, podendo ser encontrada na cavidade oral, no trato gastrointestinal e geniturinário ^{8,12,14}.

C. albicans e demais espécies podem ainda contar com alterações que as tornam resistentes às principais formas de tratamento disponíveis na atualidade ¹⁵⁻¹⁷.

1.2 *Candida glabrata*

Taxonômica e morfológicamente *C. glabrata* é uma espécie de fungo leveduriforme haplóide, comensal, que pertence à família *Saccharomycetaceae* ^{18,19}. Esta espécie é pertencente à microbiota humana e coloniza, principalmente, o trato gastrointestinal ^{20,21}.

Contudo, linhagens de *C. glabrata* patogênicas vêm aumentando em número de casos, de modo que, tornou-se grave problema de saúde pública, particularmente entre mulheres em idade fértil ²² e imunocomprometidos, devido ao alto nível de mortalidade e resistência aos antifúngicos ^{23,24}. Inquéritos epidemiológicos apontam *C. glabrata* como a segunda espécie mais isolada em infecções no sistema sanguíneo de pacientes imunocomprometidos, e a espécie mais comum em relação à resistência de antifúngicos

em hospitais ²⁵, além de ser responsável por 10% a 15% dos casos de candidíase vulvovaginal ^{26,27}.

C. glabrata não possui a capacidade de dimorfismo, ou seja, mudar de leveduras para hifas, entretanto, uma das suas principais características de patogenicidade é a produção de biofilmes, sendo uma estrutura microbiana altamente organizada, com diversas sequências de divisão celular, incorporada em uma matriz extracelular, formando uma estrutura tridimensional em superfícies ^{25,28,29}. Associado a capacidade em formar biofilme, *C. glabrata* apresenta facilidade em aderir a diferentes tipos de tecidos dos hospedeiros, como células epiteliais, endoteliais, células do sistema imunológico, entre outras ^{28,30}.

Somado a esses fatores de virulência essa espécie também é intrinsecamente resistente ao fluconazol, fármaco mundialmente empregado no tratamento de infecções por *Candida* spp. ²⁵. A principal diferença entre *C. albicans* e *C. glabrata* se dá pela resistência intrínseca ao fluconazol e aos principais antifúngicos azóis, empregados para tratamento ^{31–33}. Os mecanismos descritos acerca da resistência envolvem *upregulation* do transportador do medicamento, *overexpression* ou alteração do receptor do medicamento, modificações celulares e indução da expressão de bombas de efluxo ^{5,34}.

1.3 Resistência aos antimicrobianos do mercado

“No time to wait: securing the future from drug-resistant infection

Organização Mundial de Saúde (OMS)¹³⁵ alerta grave problema de saúde pública mundial, estima-se que até 2050 a resistência microbiana será o maior problema enfrentado. De acordo com os dados disponíveis¹, anualmente as infecções resistentes a medicamentos já causam pelo menos 700.000 mortes, incluindo 230.000 mortes por tuberculose multirresistente (*Interagency Coordination Group on Antimicrobial Resistance*, 2019). Em um cenário mais alarmante, se nenhuma ação for tomada, estima-se cerca de 10 milhões de mortes anuais até 2050, sendo que 2,4 milhões de pessoas poderão vir a óbito em países de alta renda entre 2015 e 2050.

¹ Disponível em: [WHO](https://www.who.int) (2019). Acesso em: 21/10/2021

Um dos principais fatores, se não o principal, responsável por este cenário alarmante, número crescente de micro-organismos multirresistentes, se dá por meio da prática do uso empírico de antimicrobianos, sem embasamento em evidências científicas, ou acompanhando da ausência de diagnóstico laboratorial para identificação do agente e correta indicação de tratamento ⁷.

Associado à resistência aos antifúngicos, vale pontuar que a escassez de antimicrobianos é uma realidade iminente, e a necessidade de estudos que conduzam às novas abordagens terapêuticas é indubitavelmente essencial.

1.4 Uma porta que se abre: pré e probióticos como possibilidade de novas abordagens terapêuticas adjuvantes.

Na natureza existem relações ecológicas entre os seres vivos denominadas harmônicas e desarmônicas. A competição por nutrientes e espaço é o “pontapé” que levou a premissa postulada por Herbert Spencer e mais tarde explorada por Charles Darwin: sobrevivência do mais apto, ou conceito relativo à competição pela predominância ³⁶. 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, por exemplo).

Por definição, prebióticos são carboidratos não digeridos, fermentados pela microbiota intestinal, que realizam produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) como butirato, acetato e propionato, substâncias benéficas para o organismo por auxiliarem na seleção de populações de micro-organismos que compõem a microbiota saudável ³⁷. A atividade metabólica *inter* e *intra* reinos/classes, contribui indiretamente no desenvolvimento e modulação do sistema imunológico, evitando o alojamento de patógenos na intestinal ³⁸.

Os probióticos são micro-organismos que presentes no organismo em quantidades proporcionais, promovem defesa e melhoria na resposta imunitária ³⁷. Bactérias do gênero *Lactobacillus* são amplamente empregadas como suplementos alimentares probióticos ^{39,40}. Diferentes estudos comprovaram que a presença de probióticos na mucosa intestinal

promove melhor resposta do sistema imune frente a micro-organismos patogênicos invasores ou oportunistas, além de promoverem melhora na permeabilidade intestinal ⁴¹⁻⁴⁵.

Neste sentido, os estudos empregando pré e probióticos podem ser uma “chave” para melhor compreender com se dá interações entre micro-organismos na microbiota ⁴⁶. Prebióticos proporcionam condições de crescimento aos Probióticos que atuam em conjunto em uma interação simbiótica, capaz de trazer benefícios e realizar a manutenção do ecossistema, dando suporte à microbiota, para que na presença de invasores patogênicos a resposta imunológica do hospedeiro seja mais seletiva e eficaz ⁴⁷⁻⁴⁹.

Convenientemente, a presença de probióticos ou de seus produtos metabólicos, seria benéfico, 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 malélicas - relações harmônicas e desarmônicas ^{50,51}.

Além disso, os probióticos e seus metabólitos atuam de forma direta e indireta na modulação do sistema imunológico ^{42,45,52}, o que os tornam muito importantes para o desenvolvimento da nova terapia. Esses micro-organismos também podem atuar alterando o pH do trato gastrointestinal, produzindo compostos antimicrobianos, peróxido de hidrogênio e ácidos orgânicos, competindo por sítios de ligação, estimulação de células imunomoduladoras e melhora da mucosa intestinal ^{38-41,53,54}.

Portanto, o “estado da arte” nas pesquisas que buscam propor novas abordagens terapêuticas ⁵⁵, talvez possa ser encontrado exatamente na compreensão entre as relações ecológicas que ocorrem na biota do hospedeiro humano, na tentativa de modular a balança entre quem cresce e coloniza ou não.

1.4.1 *Lactobacillus* spp.

A administração de probióticos, mais especificamente de *Lactobacillus* spp., vem sendo considerada uma promissora proposta terapêutica, até mesmo em abordagem pós-cirúrgica ⁵⁶. Diferentes estudos destacam a capacidade desses micro-organismos em reduzir complicações decorrentes de infecções em pacientes críticos ^{37,40}.

Lactobacillus spp. produzem metabólitos importantes para sua sobrevivência e colonização na microbiota, como: produção de ácido láctico, ácido acético, bacteriocinas, biosurfactantes, peróxido de hidrogênio e moléculas de co-agregação. Interessantemente,

os metabólitos secretados por essas bactérias são os achados que corroboram para a escolha dessa classe de micro-organismo para o combate ou controle das infecções causadas pelas leveduras de *Candida* spp. ^{22,43,44,51,57-62}.

Mais recentemente, um trabalho do nosso grupo demonstrou que a espécie de *Lactobacillus casei* Shirota apresentou atividade de inibição sobre o crescimento de *Candida* spp. ²². Outros estudos também apontaram um papel protetor desses lactobacilos sobre a modulação da plasticidade morfológica e da resposta imune, consequentemente no desenvolvimento da candidíase ^{58,63}.

1.4.2 Butirato de sódio - um prebiótico promissor

O butirato de sódio (NaBut) é um ácido graxo de cadeia curta (AGCC) produto da fermentação de bactérias probióticas presentes no cólon, a partir de fibra alimentar não digerida ⁶⁴. O NaBut apresenta propriedades anti-inflamatórias e anticancerígenas, além de papel como modulador epigenético em fungos patogênicos ⁶⁵.

Em um estudo conduzido por Wang e colaboradores (2018) foi observado que a combinação entre bactérias produtoras de butirato, como *Clostridium butyricum* em conjunto com *Lactobacillus acidophilus*, potencializou a atividade anti-inflamatória do butirato ⁶⁶.

Esses achados permitem sugerir que uma combinação entre este prebiótico e os probióticos lactobacilos, poderiam oferecer potencial terapêutico até mesmo contra processos infecciosos causados por micro-organismos residentes oportunistas ou invasores.

Epigeneticamente, NaBut pode atuar como inibidor de histona desacetilases (iHDAC), interferindo nos processos de remodelagem da cromatina, o que implica na expressão gênica em resposta às mudanças no ambiente ^{67,68}. As alterações epigenéticas são uma “faca-de-dois-gumes”, pois podem auxiliar o hospedeiro diminuindo inflamação, por lado, afetam negativamente expressão de virulência em patógenos eucariotos ⁶⁹⁻⁷². Devido ao seu potencial contra leveduras patogênicas, poderia ser uma promissora abordagem terapêutica ^{65,73}.

Além disso, NaBut foi testado em *C. albicans* mostrando efeitos no crescimento, na sensibilidade ao calor, na formação do tubo germinativo ⁷⁴.

Estudos recentes apontam um provável sinergismo entre iHDAC e antifúngicos podem aumentar a suscetibilidade do fungo ao medicamento, reduzindo a resistência aos antifúngicos disponíveis⁷⁵⁻⁸⁶.

Com base no compilado de evidências apresentadas, e na tentativa de atender ao “chamado” emergencial da OMS no combate a resistência microbiana, este estudo teve o objetivo de investigar o efeito de excretas metabólicas de *Lactobacillus casei* Shirota, presentes no sobrenadante de cultura pura, e do ácido graxo de cadeia curta, butirato de sódio, sobre o crescimento de leveduras de *C. albicans* e *C. glabrata*. Ainda, investigou-se possível interação entre as substâncias investigadas com fluconazol, na tentativa de propor aumento da suscetibilidade.

2. METODOLOGIA

2.1 *Candida* spp.

As linhagens empregadas neste foram: *C. albicans* American Type Culture Collection (ATCC 90028) e *C. glabrata* American Type Culture Collection (ATCC 90030), gentilmente cedidas pelo Laboratório de Microbiologia Clínica do Hospital Universitário de Brasília (HuB/UnB). Os estoques foram mantidos em meio de cultivo acrescido de glicerol [30%], sendo mantidos congelados a -20°C.

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

O meio de cultura YPD (*Yeast extract – Peptone – Dextrose*), gentilmente cedido pela professora Dra. Simoni Campos Dias (Pós-graduação de Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília), foi empregado nas análises de Concentração Inibitória Mínima (CIM) das espécies fúngicas de *Candida* spp.. Sendo o caldo composto por: extrato de levedura 1%, dextrose 2% e peptona 2%.

Para cultivo das leveduras, foi preparado o caldo YPD, aliquotado volume de 2mL distribuído em tubos de ensaio, seguido-se processo de esterilização a 121°C por 15 minutos, em autoclave à vapor. Após esterilização dos meios de cultivo, os inóculos foram preparados a partir da incubação de 10µL da suspensão de cada estoque. O cultivo de cada micro-organismo foi realizado a 37°C por 48 horas.

2.2 *Lactobacillus* spp.

A linhagem empregada foi a *L. casei* Shitora, isolada em 2019 no laboratório de Análises Clínicas do Departamento de Farmácia (ULEG/FS-UnB), pela Dra. Rosane Mansan, a partir de Yakult (Yakult® 13, Lote H1336). Os estoques foram mantidos em meio de cultivo acrescido de glicerol [30%], sendo mantidos congelados a -20°C.

O meio de cultura Lactobacilli MRS Broth Acumedia® 29 (MRS) (Neogen do Brasil, São Paulo, Brasil) foi utilizado para o cultivo da espécie de *Lactobacillus* spp.. 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%.

O meio foi suspenso em água destilada e distribuído em tubos de ensaio contendo 2mL do caldo MRS, esterilizados a 121°C por 15 minutos, em autoclave à vapor.

Nos tubos estéreis de ambos os meios de cultivo, foram adicionados 3µL da suspensão de cada amostra isolada conservadas em solução aquosa de glicerol a 30%. Após a inoculação de uma amostra por tubo, foi realizado o cultivo a 37°C por 48 horas.

2.3 Manutenção e cultivo de *Candida* spp. e *Lactobacillus* spp.

Todas as amostras foram conservadas em solução aquosa de glicerol a 30% e congeladas -20°C em microtubos de 1,5mL até utilização nas pesquisas. Em momento oportuno, os isolados foram cultivados a 37°C por 48 horas, em tubos de ensaio contendo 2mL de caldo de YPD ou MRS para emprego nos ensaios realizados.

2.4 Reagentes e soluções.

Em relação ao preparo dos reagentes, para o Butirato de Sódio (Cayman Chemical®) foi feita uma solução estoque, mantida a -20°C, sob proteção da luz, a uma concentração de 500mM, diluído com água para injetáveis. Sendo usado para os testes mais concentrados, 150µL da solução estoque, o que caracteriza 75mM de NaBut.

Para o Fluconazol foram feitas diluições com solução salina estéril a 0,9%, para a aquisição das concentrações necessárias para a análise de 8µg/mL e 32µg/mL.

No preparo do sobrenadante da cultura de *L. casei* Shiota, foram utilizadas culturas puras e frescas de *L. casei* Shiota, centrifugadas por 10 minutos a 2000rpm, utilizando

Centrífuga TDL80-2B (Arcano®) e posteriormente filtradas com filtro de membrana estéreis com poro de 0,22µm. Após filtração, o sobrenadante foi estocado a -5°C.

2.5 Microdiluição em caldo - Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para avaliar o efeito de NaBut e do sobrenadante da cultura de *L. casei* Shiota, foram realizadas por meio do ensaio de microdiluição em calda, na tentativa de investigar as concentrações capazes de interferir no crescimento das leveduras e, conseqüentemente, a CIM para o composto.

O princípio dos testes de CIM busca investigar a menor concentração de agente antimicrobiano que inibe completamente o crescimento do organismo nos tubos ou poços de microdiluição conforme detectado a olho nu e por análise em espectrofotometria⁸⁷.

Os ensaios propostos para este estudo se baseou nos protocolos do BrCast^{88,89} para ensaio de microdiluição em caldo, com algumas modificações, a saber: foram utilizadas placas de 96 poços de fundo chato, contendo caldo de YPD e 1×10^5 levedura/poço, com volume total de cada poço de 100µL. 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).

A partir disso, foram utilizadas culturas puras e frescas de *C. albicans* e *C. glabrata* cultivadas em caldo Sabouraud Dextrose a 37°C por 24 horas, e culturas puras e frescas de *L. casei* Shiota, cultivadas em caldo MRS Acumedia® 19 (Neogen do Brasil, São Paulo, Brasil), por 48 horas a 37°C.

Após o período de incubação, os cultivos de *C. albicans* e *C. glabrata* foram analisados por espectrofotometria empregando Espectrofotômetro BTS 310 (BioSystems® 23, Barcelona, Espanha), e comprimento de onda de 582nm, e as leituras em Densidade Óptica (OD) foram ajustadas.

A solução salina 0,9% foi considerada solução padrão para leitura do espectrofotômetro. Após a preparação dos inóculos com *Candida* spp., as OD foram ajustadas para valores entre 0.070 e 0.085, que correspondem ao número de micro-organismos, neste caso leveduras na concentração de 1×10^6 micro-organismos/mL. A partir dessa solução foi feita uma diluição de 1:10 em meio de cultura YPD obtendo leveduras na concentração de 1×10^5 micro-organismos/mL.

Para os grupos teste, foram realizadas, em placa, diluição seriada dos reagentes a serem analisados da seguinte forma:

Para NaBut foram testadas as seguintes concentrações:

- Linha 1 [75mM], Linha 2 [37,5mM], Linha 3 [18,7mM], Linha 4 [9,4mM], Linha 5 [4,7mM], Linha 6 [2,3mM], Linha 7 [1,2mM] e Linha 8 [0,6mM].

Para sobrenadante de *L. casei* Shirota de 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].

Sendo para análise de sinergismo utilizadas as concentrações de 37,5mM de NaBut e 25% v/v de sobrenadante de *L. casei* Shirota, pois apresentaram diminuição significativa do crescimento das leveduras estudadas, relevantes para a análise de sinergismo.

As concentrações de Fluconazol para *C. albicans* foram:

- Linha 1 [4µg/mL], Linha 2 [2µg/mL], Linha 3 [1µg/mL], Linha 4 [0,5µg/mL], Linha 5 [0,2µg/mL], Linha 6 [0,1µg/mL], Linha 7 [0,06µg/mL] e Linha 8 [0,03µg/mL].

As concentrações de Fluconazol para *C. glabrata* foram:

- Linha 1 [16µg/mL], Linha 2 [8µg/mL], Linha 3 [4µg/mL], Linha 4 [2µg/mL], Linha 5 [1µg/mL], Linha 6 [0,5µg/mL], Linha 7 [0,2µg/mL] e Linha 8 [0,1µg/mL].

Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Após a incubação inicial, foi feita a primeira análise pela leitora de microplacas do Laboratório de Produtos Naturais da FS/UnB, em densidade óptica 600nm. E posteriormente, foram adicionados 10µL de Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) em cada poço. Esse corante é incolor na forma oxidada e vermelho quando reduzido por microrganismos, devido à formação de formazano. A placa foi, novamente, incubada a 37°C por 24 horas⁹⁰. Sendo feita a correlação entre o visual e o observado na espectrofotometria.

Os controles positivos para os testes com NaBut foram as leveduras crescidas em meio de cultivo contendo somente meio YPD. Já para os testes empregando o sobrenadante de *L. casei* Shirota, os controles positivos foram acrescidos do meio MRS estéril (somente meio) nas mesmas quantidades de sobrenadantes avaliados. E como controle negativo, foram utilizados apenas os meios de cultura YPD e MRS.

Já em relação ao Fluconazol, o mesmo foi utilizado em concentrações inibitórias descritas como *breakpoint* pelo BrCast para *C. albicans* e *C. glabrata*, como controle comparativo de inibição de crescimento.

2.6 Análise de ação fungicida por meio de ensaio de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)

Após a incubação inicial, antes da adição de TTC em cada poço, foi retirada uma alíquota de 10µL de cada poço que apresentou redução de crescimento de levedura significativa a olho nu. Em seguida, a amostra foi semeada em placas contendo o meio ágar Sabouraud Dextrose (SDA), e as placas foram incubadas a 37°C por mais 24 horas. Após essa nova incubação, o número de colônias crescidas em placas foi contabilizado e o cálculo do número de UFCs foi ajustado para análise da ação antifúngica.

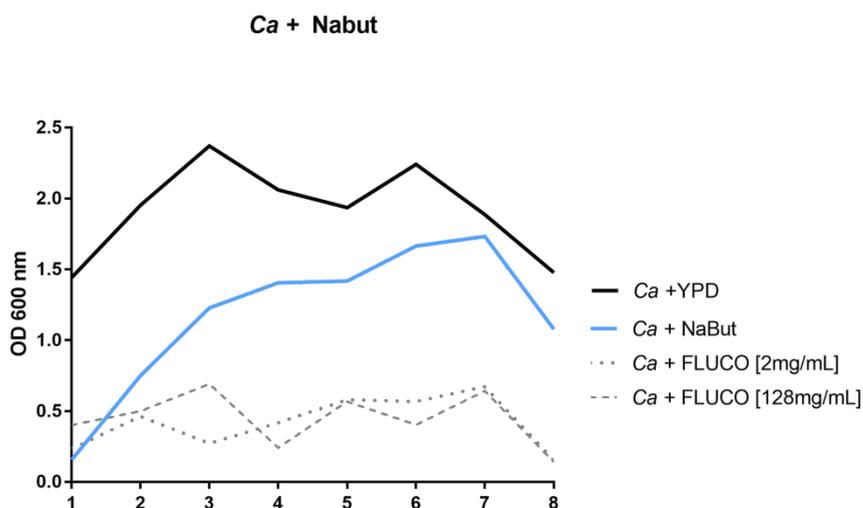
2.7 Gráficos e Estatística

Os dados foram analisados com auxílio do programa *GraphPad Prism* (versão 7 para Windows). Os dados das curvas de crescimento foram inseridos no programa para confecção dos gráficos de linha, com seus valores de densidade óptica (OD 600nm) no eixo Y e valores de concentrações (dose-resposta) apresentados em ordem numérica no eixo X. As análises estatísticas dos sinergismos foram realizadas empregando o teste paramétrico *One-way ANOVA* com pós-teste de Tukey's para múltiplas comparações. O intervalo de confiança assumido foi 95%, com desvio padrão da amostra. Considerando $p < 0,005$ como diferença significativa.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação da atividade de NaBut sobre o crescimento de espécies de *Candida* spp.

Inicialmente, foi realizada a análise em concentrações seriadas de NaBut (vide Metodologia), sendo possível observar que em *C. albicans* houve uma redução do crescimento em todas as concentrações de NaBut testadas, a partir da verificação dos dados apresentados abaixo e a olho nu (Gráfico 1; Apêndice A; Apêndice B; Apêndice C).



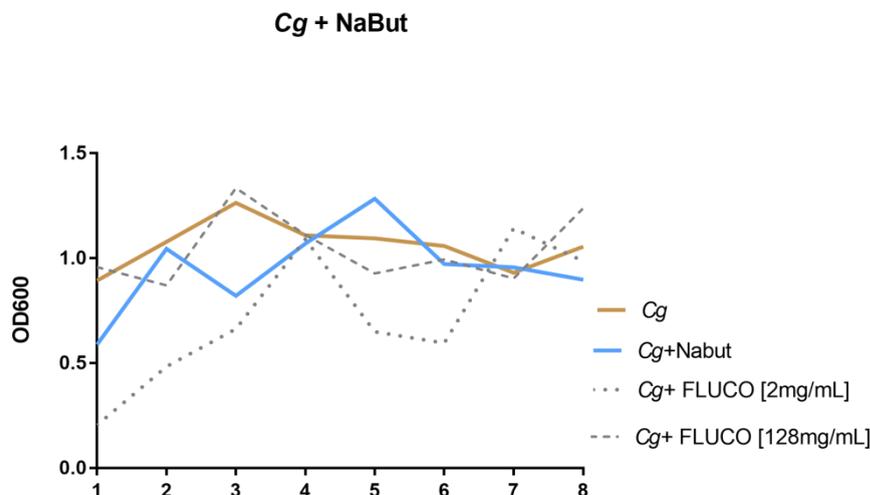
Legenda Eixo X - Concentrações:

NaBut - 1=[75 mM]; 2=[37.5mM]; 3=[18.75mM]; 4=[9.37mM]; 5=[4.68mM]; 6=[2.34mM]; 7=[1.17mM]; 8=[0.58mM]
Fluco [2mg/mL] 1=[300µg]; 2=[150µg]; 3=[75µg]; 4=[37.5µg]; 5=[18.75µg]; 6=[9.375µg]; 7=[4.68µg]; 8=[2.34µg].
Fluco [128 µg/mL] 1=[19.2µg]; 2=[9.6µg]; 3=[4.8µg]; 4=[2.4µg]; 5=[1.2µg]; 6=[0.6µg]; 7=[0.3µg]; 8=[0.15µg]

Gráfico 1 - Efeito dose-dependente de NaBut sobre crescimentos de leveduras de *C. albicans*. A análise foi realizada no intervalo de crescimento de 24 horas. O eixo Y indica a densidade óptica (600 nm), o eixo X indica as concentrações seriadas do reagente analisado. Na cor preta há o controle positivo, em que há apenas a *C. albicans* e o meio de cultura, na cor azul o grupo tratado com concentrações seriadas de NaBut e os traços pontilhados representam controle comparativo, com concentrações seriadas de Fluconazol. Os valores de 1-8 representam diluição seriada dos compostos analisados. O gráfico é a representação de duplicata biológica com dados similares.

Em *C. glabrata* houve uma redução do crescimento fúngico significativo nas três primeiras concentrações de NaBut (Gráfico 2). E na sexta e oitava concentração de NaBut, também foi possível observar redução do crescimento, mas possivelmente por conta de erros processuais. Porém, o uso do fluconazol como controle comparativo, confirma a

resistência intrínseca de *C. glabrata* ao fluconazol, o que não é observado em *C. albicans* (Gráfico 1).



Legenda Eixo X - Concentrações:

NaBut - 1=[75 mM]; 2=[37.5mM]; 3=[18.75mM]; 4=[9.37mM]; 5=[4.68mM]; 6=[2.34mM]; 7=[1.17mM]; 8=[0.58mM]
Fluco [2mg/mL] 1=[300µg]; 2=[150µg]; 3=[75µg]; 4=[37.5µg]; 5=[18.75µg]; 6=[9.375µg]; 7=[4.68µg]; 8=[2.34µg].
Fluco [128 ug/mL] 1=[19.2µg]; 2=[9.6µg]; 3=[4.8µg]; 4=[2.4µg]; 5=[1.2µg]; 6=[0.6µg]; 7=[0.3µg]; 8=[0.15µg]

Gráfico 2 - Efeito dose-dependente de NaBut sobre crescimentos de leveduras de *C. glabrata*. A análise foi realizada no intervalo de crescimento de 24 horas. O eixo Y indica a densidade óptica (600 nm), o eixo X indica as concentrações seriadas do reagente analisado. Na cor bege há o controle positivo, em que há apenas a *C. glabrata* e o meio de cultura, na cor azul o grupo tratado com concentrações seriadas de NaBut os traços pontilhados representam controle comparativo, com concentrações seriadas de Fluconazol. Os valores de 1-8 representam diluição seriada dos compostos analisados. O gráfico é a representação de duplicata biológica com dados similares.

As observações da redução do crescimento em ambas as espécies de *Candida* spp., pode ter relação com a interferência na desacetilação das histonas do fungo. Foram identificados, até o momento, onze pontos de acetilação de histonas dinâmicos em *C. albicans* e *C. glabrata*⁸⁶. Fenótipos como a transição da cor e formato da colônia, formação de biofilmes, expressão de fatores de virulência, disseminação no hospedeiro e a resistência aos antifúngicos (estudos especulam que influencia diretamente na expressão de bombas de efluxo gerando resistência aos antifúngicos da classe dos azóis) já foram observados nessas espécies quando empregando inibidores de histonas desacetilases^{83,86}.

O NaBut é produzido durante a fermentação de carboidratos no intestino de mamíferos por bactérias como *Clostridium* spp., *Eubacterium* spp. e *Butyrivibrio* spp.⁹¹⁻⁹⁶.

Apresentando concentração variável dependendo da ingesta de alimentos durante o dia, entre 5 a 24mM de NaBut⁹⁴⁻⁹⁶. A hipótese de testar NaBut como prebiótico em conjunto com *Lactobacillus* spp. se dá justamente por esta interação ocorrer na microbiota intestinal *in vivo*, onde ambos se encontram e atuam em um mesmo nicho.

As análises de UFC permitem inferir que, para ambas as espécies de *Candida* spp., a redução de crescimento observada nos gráficos 1 e 2 indica que o NaBut é um componente fungistático (Tabela 1; Apêndice D) (Tabela 2; Apêndice E). Isso porque, embora houve redução no crescimento, quando semeadas alíquotas do inóculo em placa, houve crescimento similar ao controle não tratado (positivo). Tal dado sugere que ao se remover o NaBut do meio de cultivo, as leveduras cresceriam normalmente.

Tabela 1 - Tabela referente à contagem de UFC, em análise de NaBut com *C. albicans*. Foram analisados os três primeiros pontos da curva de crescimento, no qual o primeiro ponto foi possível contar 490UFC e nos outros dois pontos se tornou incontável. Para os pontos incontáveis foi feito um padrão de pontos para indicar a diferença no crescimento das placas, sendo quanto mais pontos vermelhos, maior o crescimento de fungos. Utilizando quantidade padronizada de solução de cada poço, vide Metodologia.

<i>C. albicans</i>	75mM	37,5mM	18,7mM
NaBut	490		
NaBut		● ● ●	
NaBut			● ● ●

Tabela 2 - Tabela referente à contagem de UFC em análise de NaBut com *C. glabrata*. Sendo analisados os três primeiros pontos da curva de crescimento, nos quais todos se encontravam incontáveis. Para os pontos incontáveis foi feito um padrão de pontos para indicar a diferença no crescimento das placas, sendo quanto mais pontos vermelhos, maior o crescimento de fungos. Utilizando quantidade padronizada de solução de cada poço, vide Metodologia.

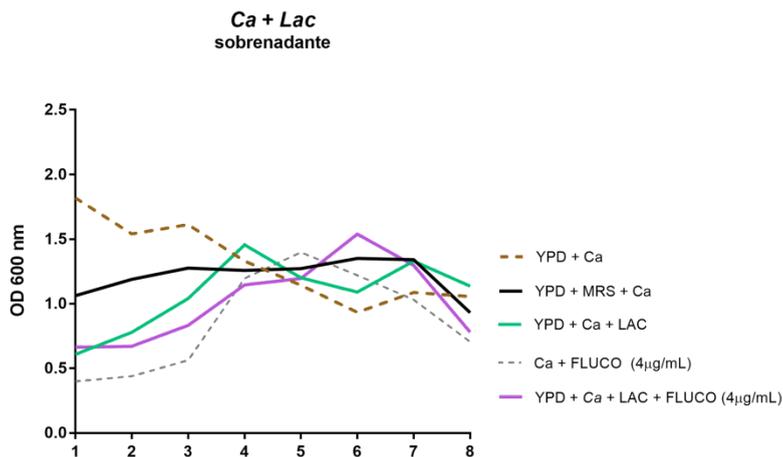
<i>C. glabrata</i>	75mM	37,5mM	18,7mM
NaBut	● ● ●		
NaBut		● ● ●	
NaBut			● ● ●

Tal observação pode ter relação com efeito de NaBut interferir no ciclo celular de células eucarióticas, além de efeitos sobre a migração celular, diferenciação e a atividade da fosfatase alcalina ^{94,97-100}. Interessantemente, no hospedeiro NaBut atua na secreção de citocinas, principalmente de IL-8, relacionado a respostas pró-inflamatórias, o que pode ser induzido pela levedura, mas não que estejam promovendo a inflamação, mas sim servindo para aumentar as defesas do hospedeiro contra os micro-organismos patogênicos ocasionais ⁹⁴. Reiterando que a presença de NaBut em resposta a leveduras oportunistas, melhora a resposta imune intestinal, o que “abre portas” para um olhar sobre novas terapias adjuvantes para o tratamento de infecções causadas por fungos.

3.2 Avaliação da atividade do sobrenadante de *L. casei* Shirota sobre o crescimento de espécies de *Candida* spp.

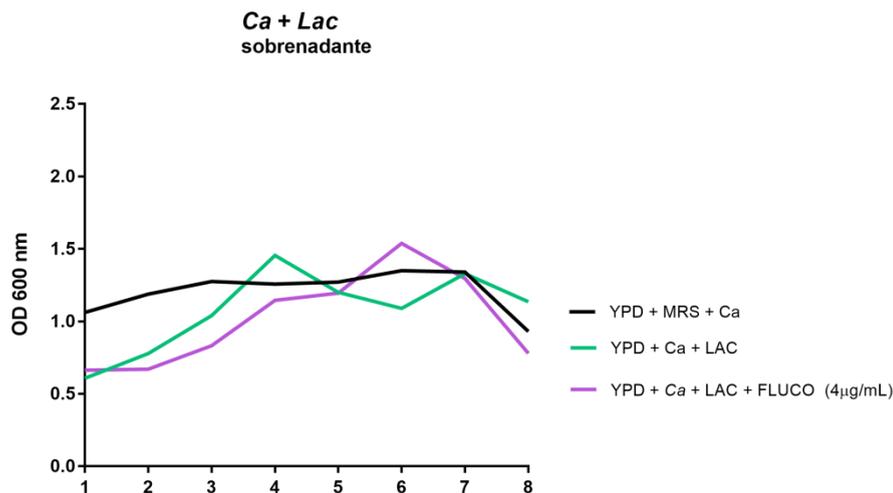
As análises das concentrações seriadas do sobrenadante da cultura de *L. casei* Shirota possibilitaram observar que houve redução do crescimento de *C. albicans* nas três primeiras concentrações de sobrenadante (Gráfico 3; Gráfico 4; Gráfico 5). E na quinta, sexta e oitava concentração de *L. casei* Shirota, também foi possível observar redução do crescimento, mas possivelmente por conta de erros processuais. Para melhor visualização foi feito um filtro das informações disponíveis, que está representada no Gráfico 4.

E para melhor visualização do efeito dose-dependente foi feito um filtro das informações disponíveis e representado no Gráfico 5, com apenas as três primeiras concentrações de sobrenadante de *L. casei* Shirota.



Legenda Eixo X - Concentrações:							
%MRS controle + - 1=[50%]; 2=[25%]; 3=[12.5%]; 4=[6.25%]; 5=[3.12%]; 6=[1.56%]; 7=[0.78%]; 8=[0.39%].							
%LAC (v/v) - 1=[50%]; 2=[25%]; 3=[12.5%]; 4=[6.25%]; 5=[3.12%]; 6=[1.56%]; 7=[0.78%]; 8=[0.39%].							
Fluconazol - 1=[4µg/mL]; 2=[2µg/mL]; 3=[1µg/mL]; 4=[0.5µg/mL]; 5=[0.25µg/mL]; 6=[0.125µg/mL]; 7=[0.062µg/mL]; 8=[0.031µg/mL].							
Flu+LAC - 1=[4µg/mL]; 2=[2µg/mL]; 3=[1µg/mL]; 4=[0.5µg/mL]; 5=[0.25µg/mL]; 6=[0.125µg/mL]; 7=[0.062µg/mL]; 8=[0.031µg/mL]. 1=[50%]; 2=[25%]; 3=[12.5%]; 4=[6.25%]; 5=[3.12%]; 6=[1.56%]; 7=[0.78%]; 8=[0.39%].							

Gráfico 3 - Efeito dose-dependente de sobrenadante de *L. casei* Shirota sobre crescimentos de leveduras de *C. albicans*. A análise foi realizada no intervalo de crescimento de 24 horas. O eixo Y indica a densidade óptica (600nm), o eixo X indica a concentrações seriadas do reagente analisado. Na cor laranja tracejada há o controle positivo, no qual há apenas a *C. albicans* e o meio de cultura padrão, na cor preta há o controle positivo do experimento, no qual há a *C. albicans*, meio de cultura padrão e meio de cultura para o crescimento de *Lactobacillus* spp., na cor verde há a análise, com *C. albicans* e concentrações seriadas de sobrenadante de *L. casei* Shirota, na cor roxa há a análise do possível sinergismo entre *C. albicans* e concentrações seriadas de Fluconazol, na faixa de tratamento e no traço pontilhado cinza, há o controle comparativo, com concentrações seriadas de Fluconazol, na faixa de tratamento. Os valores de 1-8 representam diluição seriada dos compostos analisados. O gráfico é a representação de duplicata biológica com dados similares.



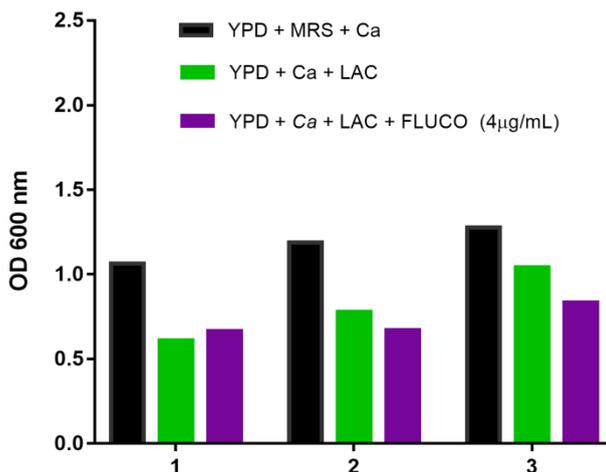
Legenda Eixo X - Concentrações:

%MRS controle + - 1=[50%]; 2=[25%]; 3=[12.5%]; 4=[6.25%]; 5=[3.12%]; 6=[1.56%]; 7=[0.78%]; 8=[0.39%].

%LAC (v/v) - 1=[50%]; 2=[25%]; 3=[12.5%]; 4=[6.25%]; 5=[3.12%]; 6=[1.56%]; 7=[0.78%]; 8=[0.39%].

Flu+LAC - 1=[4µg/mL]; 2=[2µg/mL]; 3=[1µg/mL]; 4=[0.5µg/mL]; 5=[0.25µg/mL]; 6=[0.125µg/mL]; 7=[0.062µg/mL]; 8=[0.031µg/mL].
1=[50%]; 2=[25%]; 3=[12.5%]; 4=[6.25%]; 5=[3.12%]; 6=[1.56%]; 7=[0.78%]; 8=[0.39%].

Gráfico 4 - Efeito dose-dependente de sobrenadante de *L. casei* Shirota sobre crescimentos de leveduras de *C. albicans*. A análise foi realizada no intervalo de crescimento de 24 horas. O eixo Y indica a densidade óptica (600nm), o eixo X indica a concentrações seriadas do reagente analisado. Na cor preta há o controle positivo do experimento, no qual há a *C. albicans*, meio de cultura padrão e meio de cultura para o crescimento de *Lactobacillus* spp., na cor verde há a análise, com *C. albicans* e concentrações seriadas de sobrenadante de *L. casei* Shirota e na cor roxa há a análise do possível sinergismo entre *C. albicans* e concentrações seriadas de Fluconazol, na faixa de tratamento. Os valores de 1-8 representam diluição seriada dos compostos analisados. O gráfico é a representação de duplicata biológica com dados similares.



Legenda Eixo X - Concentrações:

%LAC (v/v) - 1=[50%]; 2=[25%]; 3=[12.5%]; 4=[6.25%];

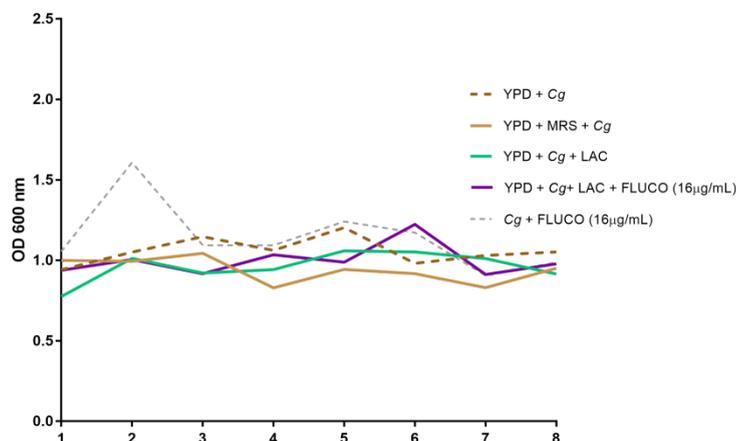
Flu+LAC - 1=[LAC(25%) + Flu 4µg/mL]; 2=[LAC(12.5%) + Flu 4µg/mL]; 3=[LAC (6.25%) + Flu 4µg/mL].

Gráfico 5 - Efeito dose-dependente de sobrenadante de *L. casei* Shirota sobre crescimentos de leveduras de *C. albicans*. A análise foi realizada no intervalo de crescimento de 24 horas. O eixo Y indica a densidade óptica (600nm), o eixo X indica a concentrações seriadas do reagente analisado. Na cor preta há o controle positivo do experimento, no qual há a *C. albicans*, meio de cultura padrão e meio de cultura para o crescimento de *Lactobacillus* spp., na cor verde há a análise, com *C. albicans* e concentrações seriadas de sobrenadante de *L. casei* Shirota e na cor roxa há a análise do possível sinergismo entre *C. albicans* e concentrações seriadas de Fluconazol, na faixa de tratamento. O gráfico é a representação de duplicata biológica com dados similares.

Em *C. glabrata* foi possível observar uma diminuição do crescimento fúngico somente no primeiro poço, com concentração de 50% (v/v) do sobrenadante de *L. casei* Shirota (Gráfico 6; Gráfico 7; Gráfico 8).

Para melhor visualização foi feito um filtro das informações disponíveis, que está representada no Gráfico 6. E para melhor visualização do efeito dose-dependente foi feito um filtro das informações disponíveis e representado no Gráfico 8, com apenas a primeira concentração de sobrenadante de *L. casei* Shirota.

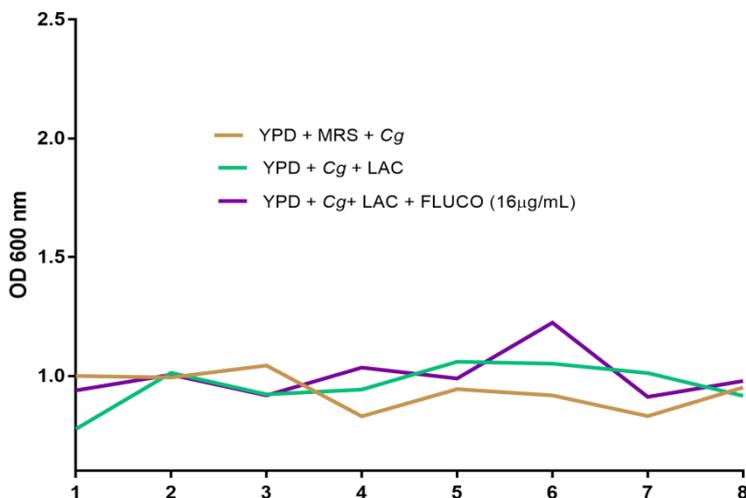
Cg + Lac
sobrenadante



Legenda Eixo X - Concentrações:								
%MRS controle + - 1=[50%]; 2=[25%]; 3=[12.5%]; 4=[6.25%]; 5=[3.12%]; 6=[1.56%]; 7=[0.78%]; 8=[0.39%].								
%LAC (v/v) - 1=[50%]; 2=[25%]; 3=[12.5%]; 4=[6.25%]; 5=[3.12%]; 6=[1.56%]; 7=[0.78%]; 8=[0.39%].								
Fluconazol - 1=[16µg/mL]; 2=[8µg/mL]; 3=[4µg/mL]; 4=[2µg/mL]; 5=[1µg/mL]; 6=[0.5µg/mL]; 7=[0.25µg/mL]; 8=[0.125µg/mL].								
Flu+LAC - 1=[16µg/mL]; 2=[8µg/mL]; 3=[4µg/mL]; 4=[2µg/mL]; 5=[1µg/mL]; 6=[0.5µg/mL]; 7=[0.25µg/mL]; 8=[0.125µg/mL].								
1=[50%]; 2=[25%]; 3=[12.5%]; 4=[6.25%]; 5=[3.12%]; 6=[1.56%]; 7=[0.78%]; 8=[0.39%].								

Gráfico 6 - Efeito dose-dependente de sobrenadante de *L. casei* Shirota sobre crescimentos de leveduras de *C. glabrata*. A análise foi realizada no intervalo de crescimento de 24 horas. O eixo Y indica a densidade óptica (600nm), o eixo X indica a concentrações seriadas do reagente analisado. Na cor laranja tracejada há o controle positivo, no qual há apenas a *C. glabrata* e o meio de cultura padrão, na cor laranja não tracejada há o controle positivo do experimento, no qual há a *C. glabrata*, meio de cultura padrão e meio de cultura para o crescimento de *Lactobacillus spp.*, na cor verde há a análise, com *C. glabrata* e concentrações seriadas de sobrenadante de *L. casei* Shirota, na cor roxa há a análise do possível sinergismo entre *C. glabrata* e concentrações seriadas de Fluconazol, na faixa de tratamento e no traço pontilhado cinza, há o controle comparativo, com concentrações seriadas de Fluconazol, na faixa de tratamento. Os valores de 1-8 representam diluição seriada dos compostos analisados. O gráfico é a representação de duplicata biológica com dados similares.

Cg + Lac
sobrenadante



Legenda Eixo X - Concentrações:

%MRS controle + - 1=[50%]; 2=[25%]; 3=[12.5%]; 4=[6.25%]; 5=[3.12%]; 6=[1.56%]; 7=[0.78%]; 8=[0.39%].

%LAC (v/v) - 1=[50%]; 2=[25%]; 3=[12.5%]; 4=[6.25%]; 5=[3.12%]; 6=[1.56%]; 7=[0.78%]; 8=[0.39%].

Fluconazol - 1=[16µg/mL]; 2=[8µg/mL]; 3=[4µg/mL]; 4=[2µg/mL]; 5=[1µg/mL]; 6=[0.5µg/mL]; 7=[0.25µg/mL]; 8=[0.125µg/mL].

Flu+LAC - 1=[16µg/mL]; 2=[8µg/mL]; 3=[4µg/mL]; 4=[2µg/mL]; 5=[1µg/mL]; 6=[0.5µg/mL]; 7=[0.25µg/mL]; 8=[0.125µg/mL].
1=[50%]; 2=[25%]; 3=[12.5%]; 4=[6.25%]; 5=[3.12%]; 6=[1.56%]; 7=[0.78%]; 8=[0.39%].

Gráfico 7 - Efeito dose-dependente de sobrenadante de *L. casei* Shirota sobre crescimentos de leveduras de *C. glabrata*. A análise foi realizada no intervalo de crescimento de 24 horas. O eixo Y indica a densidade óptica (600nm), o eixo X indica a concentrações seriadas do reagente analisado. Na cor laranja não tracejada há o controle positivo do experimento, no qual há a *C. glabrata*, meio de cultura padrão e meio de cultura para o crescimento de *Lactobacillus* spp., na cor verde há a análise, com *C. glabrata* e concentrações seriadas de sobrenadante de *L. casei* Shirota e na cor roxa há a análise do possível sinergismo entre *C. glabrata* e concentrações seriadas de Fluconazol, na faixa de tratamento. Os valores de 1-8 representam diluição seriada dos compostos analisados. O gráfico é a representação de duplicata biológica com dados similares.

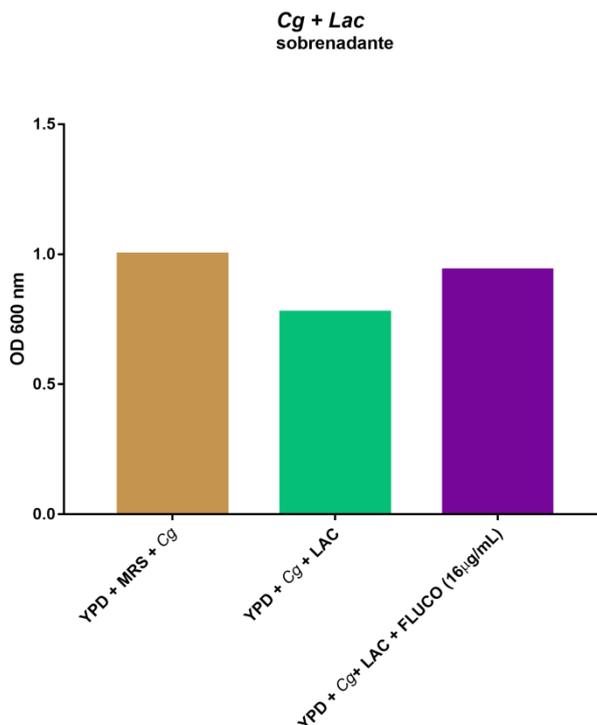


Gráfico 8 - Efeito dose-dependente de sobrenadante de *L. casei* Shirota sobre crescimentos de leveduras de *C. glabrata*. A análise foi realizada no intervalo de crescimento de 24 horas. O eixo Y indica a densidade óptica (600nm), o eixo X indica as concentrações seriadas do reagente analisado. Na cor laranja não tracejada há o controle positivo do experimento, no qual há a *C. glabrata*, meio de cultura padrão e meio de cultura para o crescimento de *Lactobacillus* spp., na cor verde há a análise, com *C. glabrata* e concentrações seriadas de sobrenadante de *L. casei* Shirota e na cor roxa há a análise do possível sinergismo entre *C. glabrata* e concentrações seriadas de Fluconazol, na faixa de tratamento. O gráfico é a representação de duplicata biológica com dados similares.

Os probióticos são utilizados para o tratamento de diversas doenças infecciosas, pois podem atuar em fatores físicos e químicos, a partir da secreção de metabólitos secundários ou AGCC, que irão ter atividade inibitória no crescimento de espécies fúngicas e produção de interleucinas (fator de necrose tumoral, IL-1b, IL-6, IL-17, IL-23) ¹⁰¹⁻¹⁰⁶. Dessa forma, o *L. casei* possui ação probiótica por possuir capacidade de competição pela adesão, produção de ácidos, bacteriocinas, biosurfactantes, peróxido de hidrogênio e moléculas de agregação, atuando sobre o crescimento de *Candida* spp. ¹⁰⁷⁻¹⁰⁹.

Conseqüentemente, estudos analisaram a atividade de *L. casei* como método profilático e terapêutico no tratamento de doenças causadas pela *Candida* spp., sendo em modelos *in vitro* e *in vivo* ¹¹⁰. Os resultados aumentaram a hipótese de que possui ação profilática, por aumentar a imunidade no local de administração, por aumentar a produção

de IL-17 durante a infecção e diminuir os níveis de IL-23 e possuir ação terapêutica, por reduzir o crescimento fúngico ^{110,111}. Além de reduzir a colonização de *Candida* spp. sem apresentar efeitos colaterais como os antifúngicos utilizados ¹¹²⁻¹¹⁵.

A cepa de *L. casei* Shirota é amplamente utilizada como probiótico, por apresentar ação de modulação do sistema imune, atenuar sintomas de infecções gastrointestinais e apresentar indícios que reduz o risco de cânceres de bexiga, cólon e mama ^{116,117}.

Contudo, vale ressaltar que poucos estudos apontam o potencial do sobrenadante de cultura pura de lactobacilos ter efeito terapêutico, e ser um produto biotecnológico natural *ready-to-use*, especialmente no tocante de uso tópico, como abordagem terapêutica adjuvante.

As análises dos dados de UFC sugerem que para ambas as espécies de *Candida* spp. a redução de crescimento indica que o sobrenadante de *L. casei* Shirota é um componente fungistático (Tabela 3; Apêndice F) (Tabela 4; Apêndice G). Isso porque, embora houve redução do crescimento, quando retira-se uma quantidade da suspensão de *Candida* spp. e sobrenadante de *L. casei* Shirota, há um crescimento em placa de cultura com meio ágar Sabouraud similar ao controle não tratado (positivo). Tal dado sugere que ao se remover o sobrenadante de *L. casei* Shirota do meio de cultivo, as leveduras cresceriam normalmente.

Tabela 3 - Tabela referente à contagem de CFU em análise de sobrenadante de *L. casei* Shirota com *C. albicans*. Sendo analisados os três primeiros pontos da curva de crescimento, no qual o primeiro ponto foi possível contar 2 UFC, CIM da análise, e nos outros dois pontos se tornou incontável. Para os pontos incontáveis foi feito um padrão de pontos para indicar a diferença no crescimento das placas, sendo quanto mais pontos vermelhos, maior o crescimento de fungos. Utilizando quantidade padronizada de solução de cada poço, vide Metodologia.

<i>C. albicans</i>	50% v/v	25% v/v	12,5% v/v
<i>L. casei shirota</i>	2		
<i>L. casei shirota</i>			
<i>L. casei shirota</i>			

Tabela 4 - Tabela referente à contagem de CFU em análise de sobrenadante de *L. casei* Shirota com *C. glabrata*. Sendo analisados os três primeiros pontos da curva de

crescimento, no qual todos se apresentam incontáveis. Para os pontos incontáveis foi feito um padrão de pontos para indicar a diferença no crescimento das placas, sendo quanto mais pontos vermelhos, maior o crescimento de fungos. Utilizando quantidade padronizada de solução de cada poço, vide Metodologia.

<i>C. glabrata</i>	50% v/v	25% v/v	12,5% v/v
<i>L. casei shirota</i>	● ● ●		
<i>L. casei shirota</i>		● ● ●	
<i>L. casei shirota</i>			● ● ●

3.3 Avaliação da atividade do sinergismo entre NaBut, sobrenadante de *L. casei* Shirota e fluconazol sobre o crescimento de espécies de *Candida* spp.

A partir dos efeitos evidenciados nos experimentos anteriores, houve a motivação de verificar se haveria sinergismos entre as opções terapêuticas testadas, ou se aumentaria a susceptibilidade ao antifúngico de escolha para o tratamento de *Candida* spp.

Logo, para testar a hipótese, foi feita uma análise com as concentrações de 37,5mM de NaBut e 25% (v/v) de sobrenadante de *L. casei* Shirota, investigando possível sinergismo, *breakpoint* verificado a partir dos ensaios anteriores. À vista disso, foi possível observar que em *C. albicans* houve sinergismo na redução do crescimento quando utilizado NaBut e sobrenadante de *L. casei* Shirota (Gráfico 9 e Apêndice L) com valor de $p < 0.0001$.

Já para análise do sobrenadante de *L. casei* Shirota e Fluconazol, não foi observada diferença significativa (Gráfico 9; Apêndice H; Apêndice J). O que pode ter relação com o pH do meio acrescido de 25% de sobrenadante de *L. casei* Shirota, dado que lactobacilos secretam ácido láctico e isso pode ter interferido na atividade do fluconazol, mesmo não havendo informações diferença significativa na absorção de fluconazol quando há variação do pH estomacal ⁵⁸.

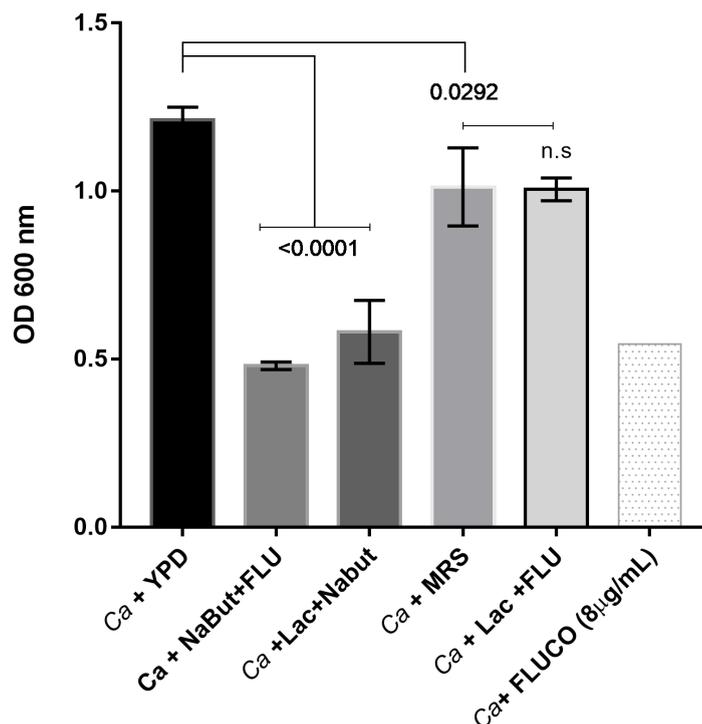


Gráfico 9 - Avaliação da interação sinérgica entre NaBut e sobrenadante de *L. casei* Shirota sobre crescimentos de leveduras de *C. albicans*. A análise foi realizada no intervalo de crescimento de 24 horas. O eixo Y indica a densidade óptica (600nm), o eixo X indica a concentrações seriadas do reagente analisado. Sendo analisadas *C. albicans* com o meio de cultivo padrão (controle positivo), *C. albicans* com NaBut 37,5mM e Fluconazol 4µg/mL, *C. albicans* com NaBut 37,5mM e sobrenadante de *L. casei* Shirota 25% (v/v), *C. albicans* com o meio de cultura padrão (YPD) e o meio de cultivo de *L. casei* Shirota (MRS) (controle positivo para sobrenadante de *L. casei* Shirota), *C. albicans* com o sobrenadante de *L. casei* Shirota 25% v/v e Fluconazol 4µg/mL e Fluconazol 4µg/mL (controle comparativo). Análise estatística: *One-way* Anova e pós-teste de Tukey 's múltiplas comparações. Intervalo de confiança de 95%, considerando $p < 0,005$ significativo. As barras de erro correspondem ao desvio padrão da amostra. N.s = não significativo.

Já em relação ao sinergismo em *C. glabrata*, foi possível observar uma maior redução do crescimento das leveduras quando combinados NaBut e sobrenadante de *L. casei* Shirota (Gráfico 10; Apêndice M). Sozinho, o tratamento com NaBut, na concentração de 37.5mM, reduziu o crescimento de *C. glabrata* significativamente ($p = 0.0052$). A combinação NaBut com sobrenadante, em relação ao controle *C. glabrata* e o meio de cultivo de *L. casei* Shirota, MRS, apresentou um valor de $p = 0.0073$. O sinergismo entre sobrenadante e NaBut foi tanto que chegou a reduzir o crescimento de leveduras mais que o CIM para Fluconazol, $p = 0.0254$.

No entanto, a combinação de NaBut com Fluconazol não apresentou significância estatística (n.s = não significativo). É possível considerar que a resistência intrínseca ao antifúngico é relevante o suficiente para que o sinergismo entre NaBut ou sobrenadante de *L. casei* Shirota com fluconazol não tenha efeito significativo em relação ao crescimento fúngico (Apêndice I; Apêndice K).

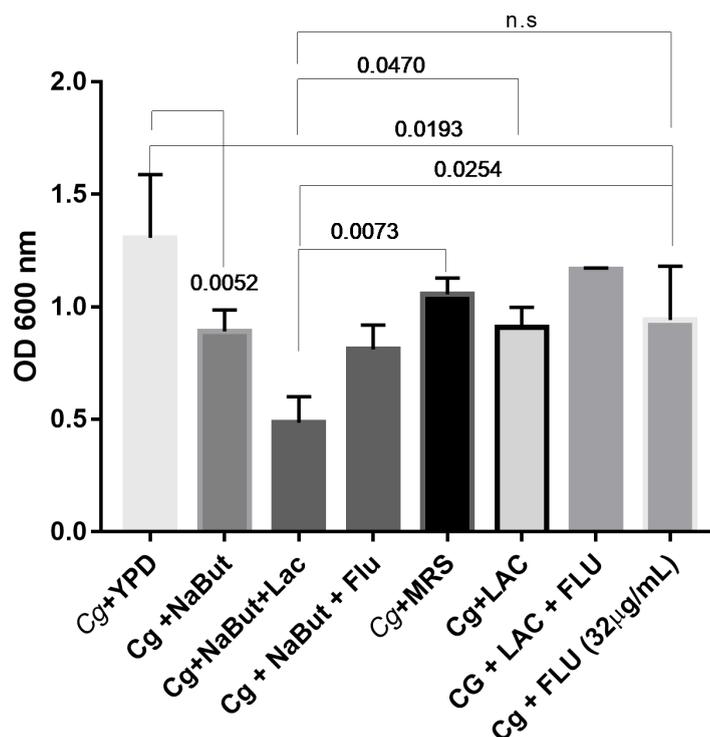


Gráfico 10 - Avaliação da interação sinérgica entre NaBut e sobrenadante de *L. casei* Shirota sobre crescimentos de leveduras de *C. glabrata*. A análise foi realizada no intervalo de crescimento de 24 horas. O eixo Y indica a densidade óptica (600nm), o eixo X indica a concentrações seriadas do reagente analisado. Sendo analisadas *C. glabrata* com o meio de cultivo padrão (controle positivo), *C. glabrata* com NaBut 37,5mM e Fluconazol 16µg/mL, *C. glabrata* com NaBut 37,5mM e sobrenadante de *L. casei* Shirota 25% (v/v), *C. glabrata* com o meio de cultura padrão (YPD) e o meio de cultivo de *L. casei* Shirota (MRS) (controle positivo para sobrenadante de *L. casei* Shirota), *C. glabrata* com o sobrenadante de *L. casei* Shirota 25% v/v e Fluconazol 16µg/mL e Fluconazol 16µg/mL (controle comparativo). Análise estatística: *One-way* Anova e pós-teste de Tukey 's múltiplas comparações. Intervalo de confiança de 95%, considerando $p < 0,005$ significativo. As barras de erro correspondem ao desvio padrão da amostra. N.s = não significativo.

Os dados com NaBut se mostraram mais eficazes, sejam combinados com o sobrenadante de cultura ou isolados. Os achados podem ter relação, com o efeito iHDAC como discutido anteriormente, pois este efeito sobre as leveduras resulta na limitação do

crescimento e desenvolvimento fúngico, alteram a formação de biofilme e melhora a eficácia dos antifúngicos existentes, por diminuir a acetilação das histonas e na regulação da transcrição^{83,86}. O que leva a hipótese de que o uso desta classe de substâncias poderia atuar como adjuvante alternativo ao tratamento das infecções fúngicas^{65,74,118-120}.

Logo, observa-se um provável sinergismo entre NaBut e fluconazol e entre NaBut e sobrenadante, para *C. albicans*. Os dados apontam que a interação entre essas substâncias se mostra tão eficaz quanto o uso isolado de fluconazol no tratamento de *C. albicans*. Para *C. glabrata*, houve uma “forte” interação entre NaBut e sobrenadante de *L. casei* Shirota. Tal associação poderá, no futuro, abranger para novas abordagens não medicamentosas, que auxiliem o combate à resistência adquirida pelo uso desmedido de fluconazol pela população.

Vale ainda destacar, que para os ensaios de sinergismos aqui apresentados, não foram empregadas as melhores concentrações inibitórias observadas nas curvas de crescimento. Novos testes com concentrações maiores que as testadas nesse ensaio, poderão resultar em dados mais interessantes para discussão de hipóteses sinérgicas.

4. CONCLUSÃO

Segundo o BrCast, o método de diluição é utilizado para estabelecer as concentrações inibitórias mínimas (CIM) de antifúngico necessárias para que vai inibir o crescimento fúngico. A partir da definição da concentração que houve inibição do crescimento fúngico, é estipulado quais os medicamentos podem ser viáveis para o controle do crescimento².

As linhagens testadas de *Candida* spp. apresentam menor sensibilidade ao tratamento de primeira escolha, fluconazol, por terem desenvolvido mecanismos de seleção contra as terapias disponíveis. E são as espécies mais prevalentes e que demandam a necessidade de hospitalização. Sendo os pacientes imunossuprimidos e em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) os mais suscetíveis.

À vista disso, os resultados deste estudo somam-se a outros que buscam sugerir abordagens terapêuticas adjuvantes ao tratamento de candidíases resistentes. Os testes com NaBut se mostraram bastante promissores, especialmente referente a *C. glabrata*, que é intrinsecamente resistente a fluconazol, o que limita a escolha de medicamentos antifúngicos para essas infecções. Os resultados apontaram redução significativa no crescimento de *C. albicans* e *C. glabrata*, mas não havendo sinergismo quando associado ao fluconazol.

Outra hipótese terapêutica adjuvante testada foi a partir de probióticos, *L. casei* Shirota, presente em um produto alimentício amplamente consumido, o Yakult. Os dados mostram que excretas metabólicas dessa bactéria possuem potencial antifúngico, presentes no sobrenadante do meio de cultivo. Houve redução significativa no crescimento de *C. albicans* e *C. glabrata* e havendo sinergismo entre o sobrenadante de lactobacilos e NaBut.

Portanto, os dados apresentados suportam a hipótese inicial deste estudo, de que os pré e pró-bióticos investigados poderiam atuar em conjunto, no controle de infecções por cândidas oportunistas, resultando em uma relação desarmônica entre bactérias e leveduras na micro ecossistema intestinal, que favorecem ao hospedeiro no tocante ao eixo saúde-microbiota em humanos.

² Disponível em:

<http://brcast.org.br/wp-content/uploads/2020/03/TSA-fungos-filamentosos-E.Def-9.3.1.pdf>
. Acesso em: 21/10/2021.

Destarte, a partir dos resultados preliminares deste estudo, espera-se contribuir “abrindo” às novas possibilidades de tratamento combinados no “combate” às candidíases mucocutâneas. Por fim, espera-se que os dados possam somar aos esforços em atender ao apelo da OMS sobre controle de micro-organismos multirresistentes.

REFERÊNCIAS

1. Spatafora JW, Aime MC, Grigoriev IV, et al. The Fungal Tree of Life: from Molecular Systematics to Genome-Scale Phylogenies. *Microbiol Spectr*; 5. Epub ahead of print September 2017. DOI: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0053-2016.
2. Limper AH, Adenis A, Le T, et al. Fungal infections in HIV/AIDS. *Lancet Infect Dis* 2017; 17: e334–e343.
3. Köhler JR, Hube B, Puccia R, et al. Fungi that Infect Humans. *Microbiol Spectr*; 5. Epub ahead of print June 2017. DOI: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0014-2016.
4. Enoch DA, Yang H, Aliyu SH, et al. The Changing Epidemiology of Invasive Fungal Infections. *Methods Mol Biol* 2017; 1508: 17–65.
5. Perlin DS, Rautemaa-Richardson R, Alastruey-Izquierdo A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. *Lancet Infect Dis* 2017; 17: e383–e392.
6. Brown GD, Denning DW, Gow NAR, et al. Hidden killers: human fungal infections. *Sci Transl Med* 2012; 4: 165rv13.
7. CDC. Biggest Threats and Data, <https://www.cdc.gov/DrugResistance/Biggest-Threats.html> (2021, accessed 24 October 2021).
8. Nami S, Mohammadi R, Vakili M, et al. Fungal vaccines, mechanism of actions and immunology: A comprehensive review. *Biomed Pharmacother* 2019; 109: 333–344.
9. Medici NP, Del Poeta M. New insights on the development of fungal vaccines: from immunity to recent challenges. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2015; 110: 966–973.
10. Sakagami T, Kawano T, Yamashita K, et al. Antifungal susceptibility trend and analysis of resistance mechanism for *Candida* species isolated from bloodstream at a Japanese university hospital. *J Infect Chemother* 2019; 25: 34–40.
11. Armstrong-James D, Brown GD, Netea MG, et al. Immunotherapeutic approaches to treatment of fungal diseases. *Lancet Infect Dis* 2017; 17: e393–e402.
12. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, et al. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 309–317.
13. Lee KK, Kubo K, Abdelaziz JA, et al. Yeast species-specific, differential inhibition of β -1,3-glucan synthesis by poacic acid and caspofungin. *Cell Surf* 2018; 3: 12–25.
14. Alexander BD, Johnson MD, Pfeiffer CD, et al. Increasing echinocandin resistance in *Candida glabrata*: clinical failure correlates with presence of FKS mutations and elevated minimum inhibitory concentrations. *Clin Infect Dis* 2013; 56: 1724–1732.

15. Spampinato C, Leonardi D. Candida infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. *Biomed Res Int* 2013; 2013: 204237.
16. Sanguinetti M, Posteraro B, Lass-Flörl C. Antifungal drug resistance among Candida species: mechanisms and clinical impact. *Mycoses* 2015; 58 Suppl 2: 2–13.
17. Kanafani ZA, Perfect JR. Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 120–128.
18. Rodríguez-Cerdeira C, Martínez-Herrera E, Carnero-Gregorio M, et al. Pathogenesis and Clinical Relevance of Candida Biofilms in Vulvovaginal Candidiasis. *Front Microbiol* 2020; 11: 544480.
19. Beyer R, Jandric Z, Zutz C, et al. Competition of *Candida glabrata* against *Lactobacillus* is Hog1 dependent. *Cell Microbiol* 2018; 20: e12943.
20. Mundula T, Ricci F, Barbeta B, et al. Effect of Probiotics on Oral Candidiasis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*; 11. Epub ahead of print 14 October 2019. DOI: 10.3390/nu11102449.
21. Charlet R, Pruvost Y, Tumba G, et al. Remodeling of the *Candida glabrata* cell wall in the gastrointestinal tract affects the gut microbiota and the immune response. *Sci Rep* 2018; 8: 3316.
22. Paniágua AL, Correia AF, Pereira LC, 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 Complement Med Ther* 2021; 21: 237.
23. Hellstein JW, Marek CL. Candidiasis: Red and White Manifestations in the Oral Cavity. *Head Neck Pathol* 2019; 13: 25–32.
24. Gabaldón T, Fairhead C. Genomes shed light on the secret life of *Candida glabrata*: not so asexual, not so commensal. *Curr Genet* 2019; 65: 93–98.
25. Timmermans B, De Las Peñas A, Castaño I, et al. Adhesins in *Candida glabrata*. *J Fungi (Basel)*; 4. Epub ahead of print 20 May 2018. DOI: 10.3390/jof4020060.
26. Paladine HL, Desai UA. Vaginitis: Diagnosis and Treatment. *Am Fam Physician* 2018; 97: 321–329.
27. Martin Lopez JE. Candidiasis (vulvovaginal). *BMJ Clin Evid*; 2015, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25775428> (2015).
28. Pristov KE, Ghannoum MA. Resistance of Candida to azoles and echinocandins worldwide. *Clin Microbiol Infect* 2019; 25: 792–798.
29. Rodrigues CF, Rodrigues ME, Silva S, et al. *Candida glabrata* Biofilms: How Far Have We Come? *J Fungi (Basel)*; 3. Epub ahead of print 1 March 2017. DOI:

10.3390/jof3010011.

30. López-Fuentes E, Gutiérrez-Escobedo G, Timmermans B, et al. *Candida glabrata*'s Genome Plasticity Confers a Unique Pattern of Expressed Cell Wall Proteins. *J Fungi (Basel)*; 4. Epub ahead of print 5 June 2018. DOI: 10.3390/jof4020067.
31. Beyda ND, John J, Kilic A, et al. FKS mutant *Candida glabrata*: risk factors and outcomes in patients with candidemia. *Clin Infect Dis* 2014; 59: 819–825.
32. Pfaller MA, Castanheira M, Lockhart SR, et al. Frequency of decreased susceptibility and resistance to echinocandins among fluconazole-resistant bloodstream isolates of *Candida glabrata*. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 1199–1203.
33. From the American Association of Neurological Surgeons (AANS), American Society of Neuroradiology (ASNR), Cardiovascular and Interventional Radiology Society of Europe (CIRSE), Canadian Interventional Radiology Association (CIRA), Congress of Neurological Surgeons (CNS), European Society of Minimally Invasive Neurological Therapy (ESMINT), European Society of Neuroradiology (ESNR), European Stroke Organization (ESO), Society for Cardiovascular Angiography and Interventions (SCAI), Society of Interventional Radiology (SIR), Society of NeuroInterventional Surgery (SNIS), and World Stroke Organization (WSO), Sacks D, Baxter B, et al. Multisociety Consensus Quality Improvement Revised Consensus Statement for Endovascular Therapy of Acute Ischemic Stroke. *Int J Stroke* 2018; 13: 612–632.
34. Cowen LE, Sanglard D, Howard SJ, et al. Mechanisms of Antifungal Drug Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2014; 5: a019752.
35. D'Andrea MM, Fraziano M, Thaller MC, et al. The Urgent Need for Novel Antimicrobial Agents and Strategies to Fight Antibiotic Resistance. *Antibiotics (Basel)*; 8. Epub ahead of print 6 December 2019. DOI: 10.3390/antibiotics8040254.
36. Schluter D. Ecology and the origin of species. *Trends Ecol Evol* 2001; 16: 372–380.
37. Sanders ME, Merenstein DJ, Reid G, et al. Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2019; 16: 605–616.
38. Prakash S, Tomaro-Duchesneau C, Saha S, et al. The gut microbiota and human health with an emphasis on the use of microencapsulated bacterial cells. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011: 981214.
39. Deidda F, Amoruso A, Allesina S, et al. In Vitro Activity of *Lactobacillus fermentum* LF5 Against Different *Candida* Species and *Gardnerella vaginalis*: A New Perspective to Approach Mixed Vaginal Infections? *J Clin Gastroenterol* 2016; 50 Suppl 2, Proceedings from the 8th Probiotics, Prebiotics & New Foods for Microbiota and Human Health meeting held in Rome, Italy on September 13-15, 2015: S168–S170.
40. Matsubara VH, Bandara HMHN, Mayer MPA, et al. Probiotics as Antifungals in Mucosal Candidiasis. *Clin Infect Dis* 2016; 62: 1143–1153.

41. Matsubara VH, Wang Y, Bandara HMHN, et al. Probiotic lactobacilli inhibit early stages of *Candida albicans* biofilm development by reducing their growth, cell adhesion, and filamentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 2016; 100: 6415–6426.
42. Madsen K. Probiotics and the immune response. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40: 232–234.
43. Mirmonsef P, Spear GT. The barrier to HIV transmission provided by genital tract *Lactobacillus* colonization. *Am J Reprod Immunol* 2014; 71: 531–536.
44. Fuochi V, Cardile V, Petronio G, et al. Biological properties and production of bacteriocins-like-inhibitory substances by *Lactobacillus sp.* strains from human vagina. *J Appl Microbiol* 2019; 126: 1541–1550.
45. Amara AA, Shibl A. Role of Probiotics in health improvement, infection control and disease treatment and management. *Saudi Pharm J* 2015; 23: 107–114.
46. Fuller R. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* 1989; 66: 365–378.
47. Kim S-K, Guevarra RB, Kim Y-T, et al. Role of Probiotics in Human Gut Microbiome-Associated Diseases. *J Microbiol Biotechnol* 2019; 29: 1335–1340.
48. Fernandes AS, Dos Santos Rodrigues S, de Souza MGA. PROBIÓTICOS, PREBIÓTICOS E SIMBIÓTICOS PARA O TRATAMENTO DE CONSTIPAÇÃO EM IDOSOS. *Revista Saúde - UNG-Ser* 2021; 15: 51.
49. Peivasteh-Roudsari L, Pirhadi M, Karami H, et al. Probiotics and food safety: an evidence-based review. *Journal of Food Safety and Hygiene*. Epub ahead of print 2019. DOI: 10.18502/jfsh.v5i1.3878.
50. Valdovinos-García LR, Abreu AT, Valdovinos-Díaz MA. Probiotic use in clinical practice: Results of a national survey of gastroenterologists and nutritionists. *Rev Gastroenterol Mex* 2019; 84: 303–309.
51. Shehata MG, El Sohaimy SA, El-Sahn MA, et al. Screening of isolated potential probiotic lactic acid bacteria for cholesterol lowering property and bile salt hydrolase activity. *Sci Ann Univ Agric Sci Vet Med* 2016; 61: 65–75.
52. Saarela M, Mogensen G, Fondén R, et al. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J Biotechnol* 2000; 84: 197–215.
53. Guo Y, Wei C, Liu C, et al. Inhibitory effects of oral *Actinomyces* on the proliferation, virulence and biofilm formation of *Candida albicans*. *Arch Oral Biol* 2015; 60: 1368–1374.
54. Matsubara VH, Bandara HMHN, Ishikawa KH, et al. The role of probiotic bacteria in managing periodontal disease: a systematic review. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2016; 14: 643–655.
55. Saad SMI. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências*

Farmacêuticas 2006; 42: 1–16.

56. Stavrou G, Giamarellos-Bourboulis EJ, Kotzampassi K. The role of probiotics in the prevention of severe infections following abdominal surgery. *Int J Antimicrob Agents* 2015; 46 Suppl 1: S2–4.
57. Mehdi-Alamdarloo S, Ameri A, Moghimipour E, et al. Formulation development of a topical probiotic gel for antidermatophytosis effect. *Jundishapur J Nat Pharm Prod*; 11. Epub ahead of print 15 March 2016. DOI: 10.17795/jjnpp-35893.
58. Tachedjian G, Aldunate M, Bradshaw CS, et al. The role of lactic acid production by probiotic *Lactobacillus* species in vaginal health. *Res Microbiol* 2017; 168: 782–792.
59. Satpute SK, Kulkarni GR, Banpurkar AG, et al. Biosurfactant/s from *Lactobacilli* species: Properties, challenges and potential biomedical applications. *J Basic Microbiol* 2016; 56: 1140–1158.
60. Sgibnev A V, A Kremleva E. Vaginal Protection by H₂O₂-Producing *Lactobacilli*. *Jundishapur J Microbiol* 2015; 8: e22913.
61. Kovachev S. Defence factors of vaginal *Lactobacilli*. *Crit Rev Microbiol* 2018; 44: 31–39.
62. Aroutcheva A, Gariti D, Simon M, et al. Defense factors of vaginal *Lactobacilli*. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 185: 375–379.
63. Kosgey JC, Jia L, Fang Y, et al. Probiotics as antifungal agents: Experimental confirmation and future prospects. *J Microbiol Methods* 2019; 162: 28–37.
64. Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* 2013; 504: 446–450.
65. Brandão FAS, Derengowski LS, Albuquerque P, et al. Histone deacetylases inhibitors effects on *Cryptococcus neoformans* major virulence phenotypes. *Virulence* 2015; 6: 1–13.
66. Wang Y, Gu Y, Fang K, et al. *Lactobacillus acidophilus* and *Clostridium butyricum* ameliorate colitis in murine by strengthening the gut barrier function and decreasing inflammatory factors. *Benef Microbes* 2018; 9: 775–787.
67. Silva LG, Ferguson BS, Avila AS, et al. Sodium propionate and sodium butyrate effects on histone deacetylase (HDAC) activity, histone acetylation, and inflammatory gene expression in bovine mammary epithelial cells. *J Anim Sci* 2018; 96: 5244–5252.
68. Terova G, Díaz N, Rimoldi S, et al. Effects of sodium butyrate treatment on histone modifications and the expression of genes related to epigenetic regulatory mechanisms and immune response in European sea bass (*Dicentrarchus Labrax*) fed a plant-based diet. *PLoS One* 2016; 11: e0160332.
69. Cui L, Miao J, Furuya T, et al. Histone acetyltransferase inhibitor anacardic acid causes changes in global gene expression during in vitro *Plasmodium falciparum*

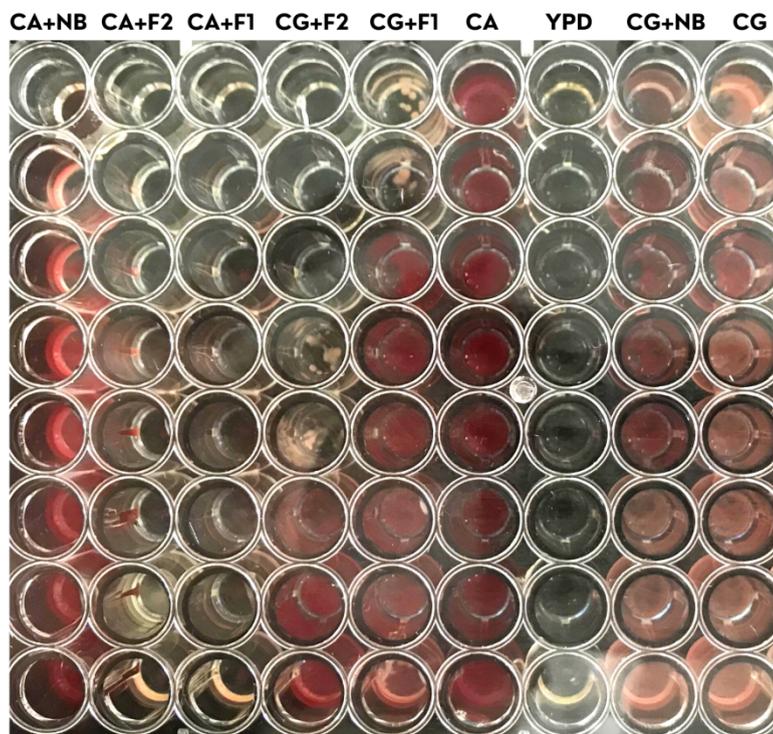
- development. *Eukaryot Cell* 2008; 7: 1200–1210.
70. Lohse MB, Johnson AD. Temporal anatomy of an epigenetic switch in cell programming: the white-opaque transition of *C. albicans*. *Mol Microbiol* 2010; 78: 331–343.
 71. Klar AJ, Srikantha T, Soll DR. A histone deacetylation inhibitor and mutant promote colony-type switching of the human pathogen *Candida albicans*. *Genetics* 2001; 158: 919–924.
 72. Nguyen LN, Lopes LCL, Cordero RJB, et al. Sodium butyrate inhibits pathogenic yeast growth and enhances the functions of macrophages. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66: 2573–2580.
 73. Simonetti G, Passariello C, Rotili D, et al. Histone deacetylase inhibitors may reduce pathogenicity and virulence in *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res* 2007; 7: 1371–1380.
 74. Smith WL, Edlind TD. Histone deacetylase inhibitors enhance *Candida albicans* sensitivity to azoles and related antifungals: correlation with reduction in CDR and ERG upregulation. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 3532–3539.
 75. Wurtele H, Tsao S, Lépine G, et al. Modulation of histone H3 lysine 56 acetylation as an antifungal therapeutic strategy. *Nat Med* 2010; 16: 774–780.
 76. Hnisz D, Bardet AF, Nobile CJ, et al. A histone deacetylase adjusts transcription kinetics at coding sequences during *Candida albicans* morphogenesis. *PLoS Genet* 2012; 8: e1003118.
 77. Nobile CJ, Fox EP, Hartooni N, et al. A histone deacetylase complex mediates biofilm dispersal and drug resistance in *Candida albicans*. *MBio* 2014; 5: e01201–14.
 78. Brandão F, Esher SK, Ost KS, et al. HDAC genes play distinct and redundant roles in *Cryptococcus neoformans* virulence. *Sci Rep* 2018; 8: 5209.
 79. Al-Dhaheri RS, Douglas LJ. Apoptosis in *Candida* biofilms exposed to amphotericin B. *J Med Microbiol* 2010; 59: 149–157.
 80. Stevenson JS, Liu H. Regulation of white and opaque cell-type formation in *Candida albicans* by Rtt109 and Hst3. *Mol Microbiol* 2011; 81: 1078–1091.
 81. Lu Y, Su C, Liu H. A GATA transcription factor recruits Hda1 in response to reduced Tor1 signaling to establish a hyphal chromatin state in *Candida albicans*. *PLoS Pathog* 2012; 8: e1002663.
 82. Rajasekharan SK, Ramesh S, Bakkiyaraj D. Synergy of flavonoids with HDAC inhibitor: new approach to target *Candida tropicalis* biofilms. *J Chemother* 2015; 27: 246–249.
 83. Li X, Cai Q, Mei H, et al. The Rpd3/Hda1 family of histone deacetylases regulates

- azole resistance in *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother* 2015; 70: 1993–2003.
84. Pfaller MA, Rhomberg PR, Messer SA, et al. In vitro activity of a Hos2 deacetylase inhibitor, MGCD290, in combination with echinocandins against echinocandin-resistant *Candida* species. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2015; 81: 259–263.
 85. Zhang L, Xu W. Histone deacetylase inhibitors for enhancing activity of antifungal agent: a patent evaluation of WO2014041424(A1). *Expert Opin Ther Pat* 2015; 25: 237–240.
 86. Garnaud C, Champlébourg M, Maubon D, et al. Histone deacetylases and their inhibition in *Candida* species. *Front Microbiol* 2016; 7: 1–10.
 87. Barry AL, Jones RN, Gavan TL. Evaluation of the micro-media system for quantitative antimicrobial drug susceptibility testing: a collaborative study. *Antimicrob Agents Chemother* 1978; 13: 61–69.
 88. ESCMID-European Society of Clinical Microbiology, Diseases I. EUCAST: AST of fungi, <http://www.eucast.org/astoffungi/> (accessed 28 March 2020).
 89. Arendrup MC, Prakash A, Meletiadis J, et al. Comparison of EUCAST and CLSI reference microdilution MICs of eight antifungal compounds for *Candida auris* and associated tentative epidemiological cutoff values. *Antimicrob Agents Chemother*; 61. Epub ahead of print June 2017. DOI: 10.1128/aac.00485-17.
 90. Beloti V, Barros MAF, Freitas JC de, et al. Frequency of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) non-reducing bacteria in pasteurized milk. *Rev Microbiol* 1999; 30: 137–140.
 91. Barcenilla A, Pryde SE, Martin JC, et al. Phylogenetic relationships of butyrate-producing bacteria from the human gut. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66: 1654–1661.
 92. Hespell RB, Wolf R, Bothast RJ. Fermentation of xylans by *Butyrivibrio fibrisolvens* and other ruminal bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1987; 53: 2849–2853.
 93. Sharp R, Macfarlane GT. Chemostat enrichments of human feces with resistant starch are selective for adherent butyrate-producing clostridia at high dilution rates. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66: 4212–4221.
 94. Saegusa S, Totsuka M, Kaminogawa S, et al. *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* induce interleukin-8 production from intestinal epithelial-like Caco-2 cells in the presence of butyric acid. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2004; 41: 227–235.
 95. Cummings JH. Short chain fatty acids in the human colon. *Gut* 1981; 22: 763–779.
 96. Cummings JH, Pomare EW, Branch WJ, et al. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut* 1987; 28: 1221–1227.
 97. Fusunyan RD, Quinn JJ, Fujimoto M, et al. Butyrate switches the pattern of

- chemokine secretion by intestinal epithelial cells through histone acetylation. *Mol Med* 1999; 5: 631–640.
98. Fusunyan RD, Quinn JJ, Ohno Y, et al. Butyrate enhances interleukin (IL)-8 secretion by intestinal epithelial cells in response to IL-1beta and lipopolysaccharide. *Pediatr Res* 1998; 43: 84–90.
 99. Harrison LE, Wang QM, Studzinski GP. Butyrate-induced G2/M block in Caco-2 colon cancer cells is associated with decreased p34cdc2 activity. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999; 222: 150–156.
 100. Huang N, Katz JP, Martin DR, et al. Inhibition of IL-8 gene expression in Caco-2 cells by compounds which induce histone hyperacetylation. *Cytokine* 1997; 9: 27–36.
 101. Murzyn A, Krasowska A, Stefanowicz P, et al. Capric acid secreted by *S. boulardii* inhibits *C. albicans* filamentous growth, adhesion and biofilm formation. *PLoS One* 2010; 5: e12050.
 102. Graham CE, Cruz MR, Garsin DA, et al. *Enterococcus faecalis* bacteriocin EntV inhibits hyphal morphogenesis, biofilm formation, and virulence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017; 114: 4507–4512.
 103. Kunyeit L, Kurrey NK, Anu-Appaiah KA, et al. Probiotic Yeasts Inhibit Virulence of Non-albicans Candida Species. *MBio*; 10. Epub ahead of print 15 October 2019. DOI: 10.1128/mBio.02307-19.
 104. Hager CL, Isham N, Schrom KP, et al. Effects of a Novel Probiotic Combination on Pathogenic Bacterial-Fungal Polymicrobial Biofilms. *MBio*; 10. Epub ahead of print 2 April 2019. DOI: 10.1128/mBio.00338-19.
 105. Phaopongthai J, Wiyakrutta S, Meksuriyen D, et al. Azole-synergistic anti-candidal activity of altenusin, a biphenyl metabolite of the endophytic fungus *Alternaria alternata* isolated from *Terminalia chebula* Retz. *J Microbiol* 2013; 51: 821–828.
 106. Marranzino G, Villena J, Salva S, et al. Stimulation of macrophages by immunobiotic *Lactobacillus* strains: influence beyond the intestinal tract. *Microbiol Immunol* 2012; 56: 771–781.
 107. Spurbeck RR, Arvidson CG. *Lactobacillus jensenii* surface-associated proteins inhibit *Neisseria gonorrhoeae* adherence to epithelial cells. *Infect Immun* 2010; 78: 3103–3111.
 108. Köhler GA, Assefa S, Reid G. Probiotic interference of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus reuteri* RC-14 with the opportunistic fungal pathogen *Candida albicans*. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2012; 2012: 636474.
 109. Sabia C, Anacarso I, Bergonzini A, et al. Detection and partial characterization of a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus fermentum* CS57 isolated from human vaginal secretions. *Anaerobe* 2014; 26: 41–45.
 110. Liao H, Liu S, Wang H, et al. Enhanced antifungal activity of bovine

- lactoferrin-producing probiotic *Lactobacillus casei* in the murine model of vulvovaginal candidiasis. *BMC Microbiol* 2019; 19: 7.
111. Ribeiro FC, Rossoni RD, de Barros PP, et al. Action mechanisms of probiotics on *Candida spp.* and candidiasis prevention: an update. *J Appl Microbiol* 2020; 129: 175–185.
 112. Rodríguez-Cerdeira C, Gregorio MC, Molares-Vila A, et al. Biofilms and vulvovaginal candidiasis. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2019; 174: 110–125.
 113. Kim J-M, Park YJ. Probiotics in the Prevention and Treatment of Postmenopausal Vaginal Infections: Review Article. *J Menopausal Med* 2017; 23: 139–145.
 114. Gonçalves B, Ferreira C, Alves CT, et al. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiology, microbiology and risk factors. *Crit Rev Microbiol* 2016; 42: 905–927.
 115. Sobel JD. Recurrent vulvovaginal candidiasis. *Am J Obstet Gynecol* 2016; 214: 15–21.
 116. Toi M, Hirota S, Tomotaki A, et al. Probiotic Beverage with Soy Isoflavone Consumption for Breast Cancer Prevention: A Case-control Study. *Curr Nutr Food Sci* 2013; 9: 194–200.
 117. Sur D, Manna B, Niyogi SK, et al. Role of probiotic in preventing acute diarrhoea in children: a community-based, randomized, double-blind placebo-controlled field trial in an urban slum. *Epidemiol Infect* 2011; 139: 919–926.
 118. Robbins N, Leach MD, Cowen LE. Lysine deacetylases Hda1 and Rpd3 regulate Hsp90 function thereby governing fungal drug resistance. *Cell Rep* 2012; 2: 878–888.
 119. Pfaller MA, Messer SA, Georgopapadakou N, et al. Activity of MGCD290, a Hos2 histone deacetylase inhibitor, in combination with azole antifungals against opportunistic fungal pathogens. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 3797–3804.
 120. Lamoth F, Juvvadi PR, Soderblom EJ, et al. Identification of a key lysine residue in heat shock protein 90 required for azole and echinocandin resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58: 1889–1896.

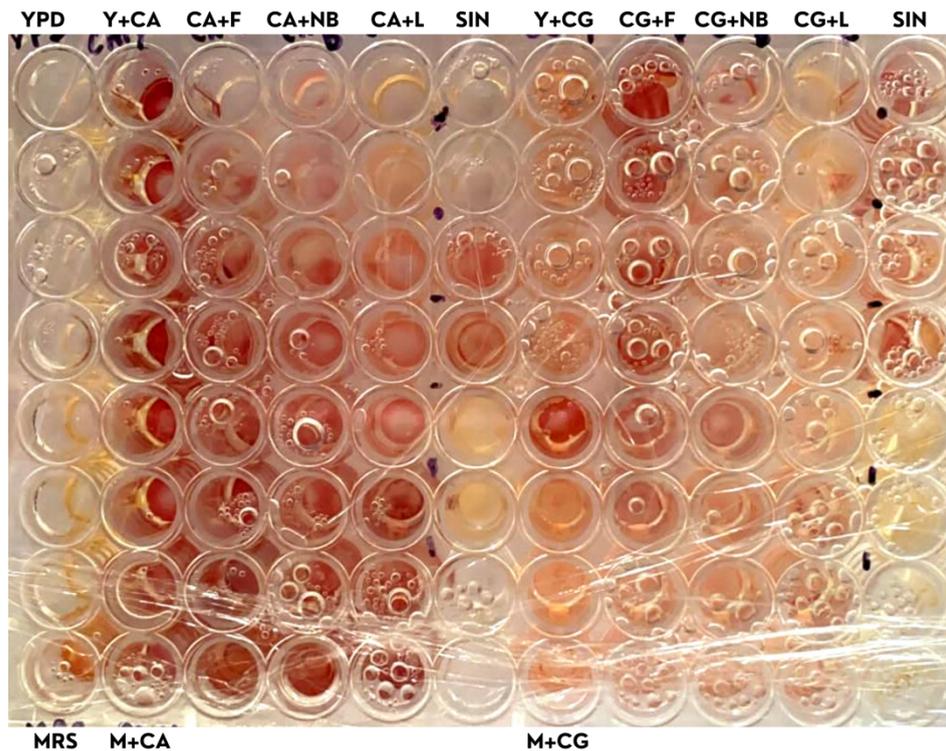
APÊNDICE



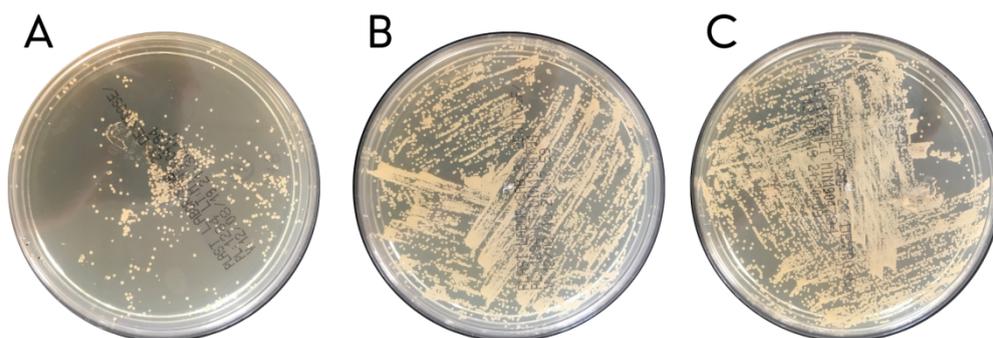
Apêndice A - Esta imagem é referente ao primeiro Curva de crescimento - CIM feito para a análise do NaBut e da viabilidade do Fluconazol. 1 - *C. albicans* e NaBut; 2 - *C. albicans* + Fluconazol (2mg/mL); 3 - *C. albicans* + Fluconazol (128 μ g/mL); 4 - *C. glabrata* + Fluconazol (2mg/mL); 5 - *C. glabrata* + Fluconazol (128 μ g/mL); 6 - *C. albicans*; 7 - Meio de cultura YPD; 8 - *C. glabrata* + NaBut; 9 - *C. glabrata*. Sendo feita a diluição seriada de todos os reagentes analisados, vide Metodologia.



Apêndice B - Esta imagem é referente ao segundo Curva de crescimento - CIM feito para a análise do sobrenadante de *L. casei* Shitora. 1 - Meio de cultura MRS; 2 - Meio de cultura YPD; 3 - *C. albicans* + YPD; 4 - *C. glabrata* + YPD; 5 - *C. albicans* + YPD + MRS; 6 - *C. glabrata* + YPD + MRS; 7 - *C. albicans* + YPD + Sobrenadante de *L. casei* Shitora; 8 - *C. glabrata* + YPD + Sobrenadante de *L. casei* Shitora; 9 - *C. albicans* + YPD + Sobrenadante de *L. casei* Shitora + Fluconazol (4 μ g/mL); 10 - *C. glabrata* + YPD + Sobrenadante de *L. casei* Shitora + Fluconazol (16 μ g/mL); 11 - *C. albicans* + Fluconazol (4 μ g/mL); 12 - *C. glabrata* + Fluconazol (16 μ g/mL). Sendo feita a diluição seriada de todos os reagentes analisados, vide Metodologia.



Apêndice C - Esta imagem é referente ao primeiro Curva de crescimento - CIM feito para a análise do possível sinergismo entre NaBut e o Sobrenadante de *L. casei* Shitora. 1 - 4 poços referentes ao meio de cultura YPD e 4 poços referentes ao meio de cultura MRS; 2 - 4 poços referentes a *C. albicans* + YPD e 4 poços referentes a *C. albicans* + YPD + MRS; 3 - *C. albicans* + Fluconazol (4 μ g/mL); 4 - *C. albicans* + NaBut; 5 - *C. albicans* + Sobrenadante de *L. casei* Shitora; 6 - 2 poços referentes a *C. albicans* + NaBut + Fluconazol (4 μ g/mL), 2 poços referentes a *C. albicans* + Sobrenadante de *L. casei* Shitora + Fluconazol (4 μ g/mL) e 2 poços referentes a *C. albicans* + NaBut + Sobrenadante de *L. casei* Shitora; 7 - 4 poços referentes a *C. glabrata* + YPD e 4 poços referentes a *C. glabrata* + YPD + MRS; 8 - *C. glabrata* + Fluconazol (16 μ g/mL); 9 - *C. glabrata* + NaBut; 10 - *C. glabrata* + Sobrenadante de *L. casei* Shitora; 11 - 2 poços referentes a *C. glabrata* + NaBut + Fluconazol (4 μ g/mL), 2 poços referentes a *C. glabrata* + Sobrenadante de *L. casei* Shitora + Fluconazol (4 μ g/mL) e 2 poços referentes a *C. glabrata* + NaBut + Sobrenadante de *L. casei* Shitora. Sendo feita a diluição seriada de todos os reagentes analisados, vide Metodologia.



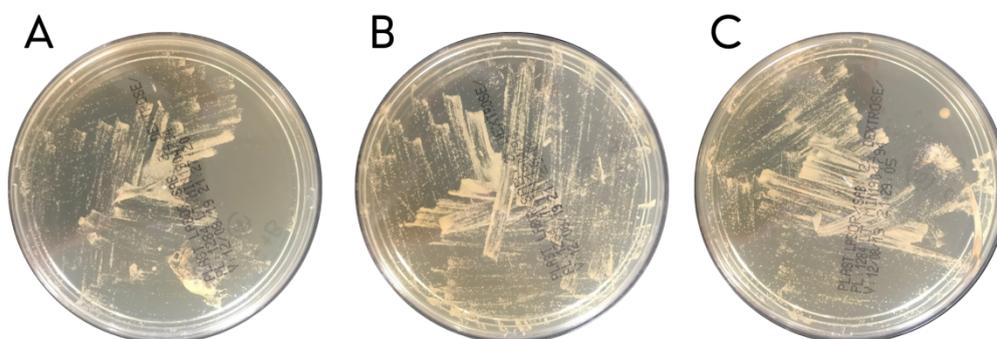
Legenda - Concentrações:

A - NaBut 75mM

B - NaBut 37,5mM

C - NaBut 18,7mM

Apêndice D - Imagem referente à contagem de CFU em análise de NaBut com *C. albicans*. Sendo analisados os três primeiros pontos da curva de crescimento, vide Metodologia, no qual o primeiro ponto/primeira placa foi possível contar 490 UFC e nos outros dois pontos se tornou incontável. No entanto, foi possível observar que na segunda placa há menos crescimento de *C. albicans* que na terceira placa.



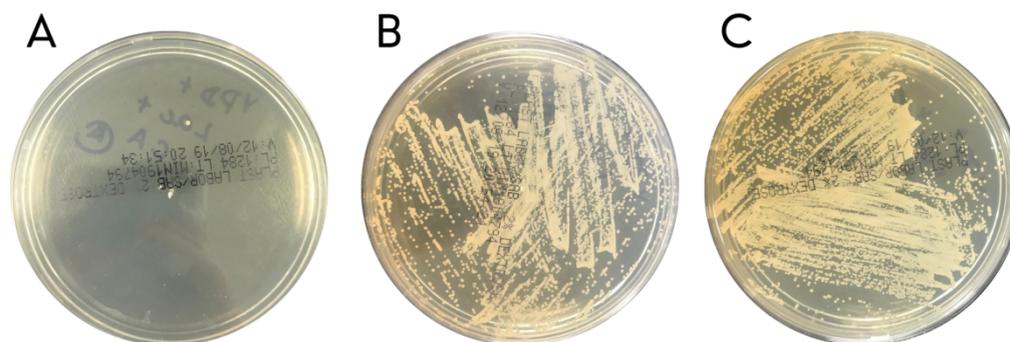
Legenda - Concentrações:

A - NaBut 75mM

B - NaBut 37,5mM

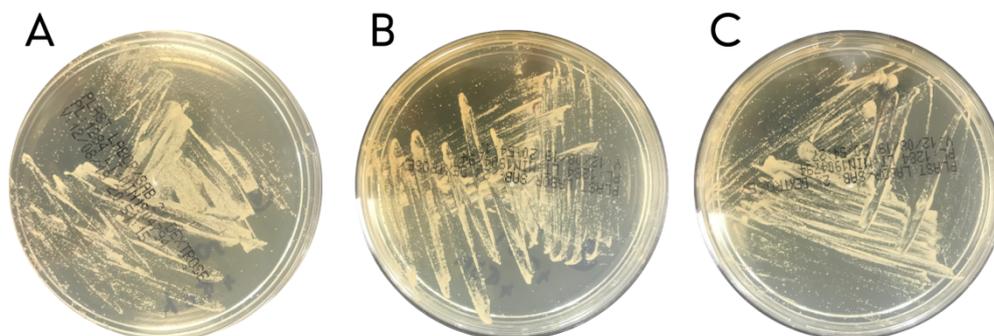
C - NaBut 18,7mM

Apêndice E - Imagem referente à contagem de UFC em análise de NaBut com *C. glabrata*. Sendo analisados os três primeiros pontos da curva de crescimento, vide Metodologia, no qual em todos os pontos/placas se apresenta incontável. No entanto, foi possível observar que na primeira placa há menos crescimento de *C. glabrata* que na segunda placa, que há menos crescimento de *C. glabrata* que na terceira placa.



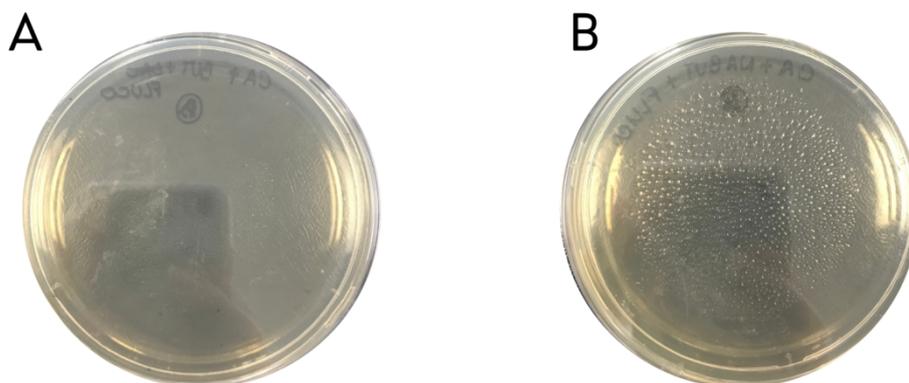
Legenda - Concentrações:
 A - *L. casei shirota* 50% v/v
 B - *L. casei shirota* 25% v/v
 C - *L. casei shirota* 12,5% v/v

Apêndice F - Imagem referente à contagem de UFC em análise de sobrenadante de *L. casei* Shiota com *C. albicans*. Sendo analisados os três primeiros pontos da curva de crescimento, vide Metodologia, no qual o primeiro ponto/primeira placa foi possível contar 2 UFC, CIM da análise, e nos outros dois pontos se tornou incontável. No entanto, foi possível observar que na segunda placa há menos crescimento de *C. albicans* que na terceira placa.



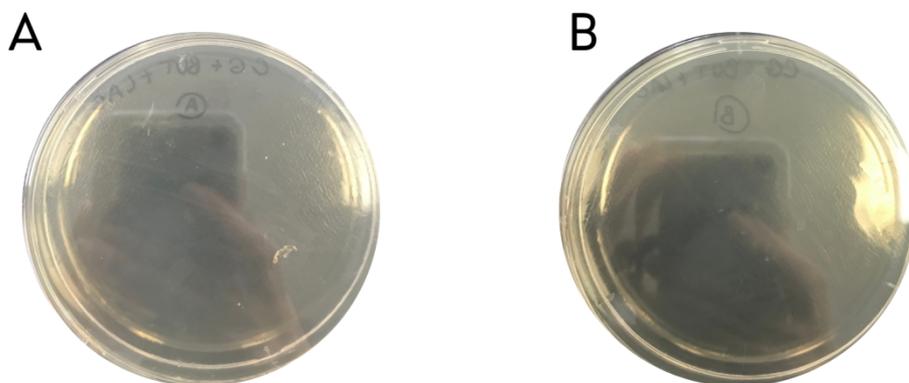
Legenda - Concentrações:
 A - *L. casei shirota* 50% v/v
 B - *L. casei shirota* 25% v/v
 C - *L. casei shirota* 12,5% v/v

Apêndice G - Imagem referente à contagem de CFU em análise de sobrenadante de *L. casei* Shiota com *C. glabrata*. Sendo analisados os três primeiros pontos da curva de crescimento, vide Metodologia, no qual em todos os pontos/placas se apresentava incontável. No entanto, foi possível observar que na primeira placa há menos crescimento de *C. glabrata* que na segunda placa, que há menos crescimento de *C. glabrata* que na terceira placa.



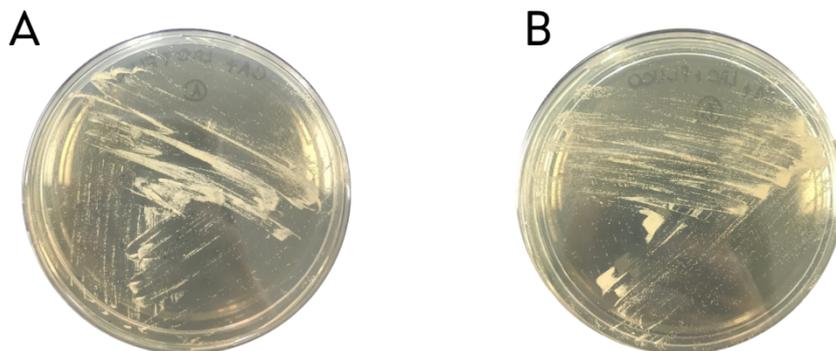
Legenda - Concentrações:
A e B - Fluconazol 4 μ g/mL + NaBut 75mM

Apêndice H - Imagem referente à contagem de UFC em análise de NaBut 37,5mM e Fluconazol 4 μ g/mL com *C. albicans*. Sendo analisados os dois poços que apresentavam as mesmas características, vide Metodologia, no qual em todas as placas se apresentavam incontáveis.



Legenda - Concentrações:
A e B - NaBut 75mM + sobrenadante *L. casei shirota* 25% v/v

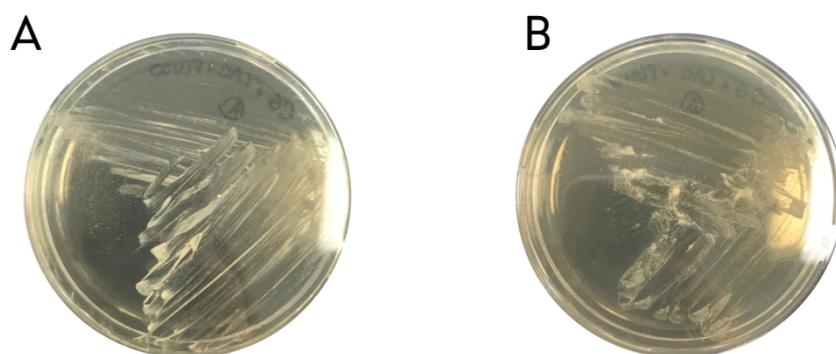
Apêndice I - Imagem referente à contagem de UFC em análise de NaBut 37,5mM e Fluconazol 4 μ g/mL com *C. glabrata*. Sendo analisados os dois poços que apresentavam as mesmas características, vide Metodologia, no qual em ambas as placas não foi possível contar nenhum UFC.



Legenda - Concentrações:

A e B - Fluconazol 4 μ g/mL + sobrenadante de L. casei shirota 25% v/v

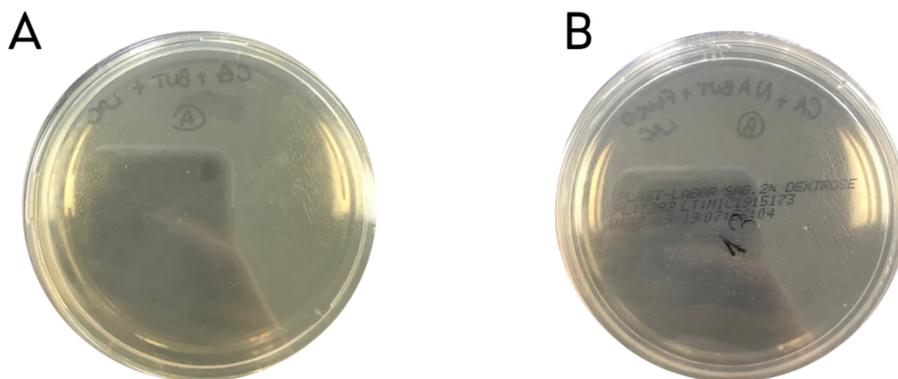
Apêndice J - Imagem referente à contagem de UFC em análise de *L. casei* Shirota 25% v/v e Fluconazol 4 μ g/mL com *C. albicans*. Sendo analisados os dois poços que apresentavam as mesmas características, vide Metodologia, no qual em todas as placas se apresentavam incontáveis.



Legenda - Concentrações:

A e B - Fluconazol 4 μ g/mL + sobrenadante de L. casei shirota 25% v/v

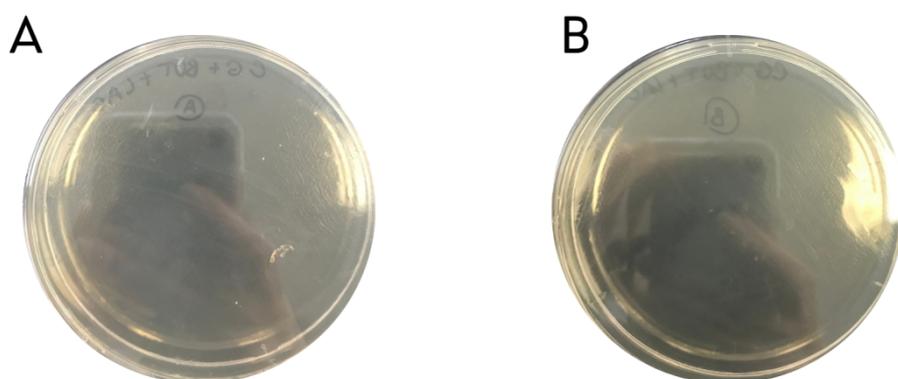
Apêndice K - Imagem referente à contagem de UFC em análise de *L. casei* Shirota 25% v/v e Fluconazol 16 μ g/mL com *C. glabrata*. Sendo analisados os dois poços que apresentavam as mesmas características, vide Metodologia, no qual em todas as placas se apresentavam incontáveis.



Legenda - Concentrações:

A e B - NaBut 75mM + sobrenadante *L. casei shirota* 25% v/v

Apêndice L - Imagem referente à contagem de UFC em análise de NaBut 37,5mM e sobrenadante de *L. casei* Shirota 25% v/v com *C. albicans*. Sendo analisados os dois poços que apresentavam as mesmas características, vide Metodologia, no qual em ambas as placas não foi possível contar nenhum UFC.



Legenda - Concentrações:

A e B - NaBut 75mM + sobrenadante *L. casei shirota* 25% v/v

Apêndice M - Imagem referente à contagem de UFC em análise de NaBut 37,5mM e sobrenadante de *L. casei* Shirota 25% v/v com *C. glabrata*. Sendo analisados os dois poços que apresentavam as mesmas características, vide Metodologia, no qual em ambas as placas não foi possível contar nenhum CFU.