



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL**

**LUCAS RODRIGUES DA SILVA**

**Avaliação do efeito de pósbiótico de *Lactobacillus spp.* e butirato de sódio  
contra *Pseudomonas aeruginosa*.**

*Brasília, DF*  
*2024*

**Avaliação do efeito de pósbiótico de *Lactobacillus spp.* e butirato de sódio contra *Pseudomonas aeruginosa*.**

**LUCAS RODRIGUES DA SILVA**

Trabalho de Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do título de mestre em Medicina Tropical.

Área de concentração: Biologia das Doenças Infecciosas e Parasitárias

**Orientadora:** Profa. Dra. Fabiana Brandão Alves Silva.



*Brasília, DF*  
2024

## FICHA CATALOGRÁFICA

Ra Rodrigues da Silva, Lucas  
Avaliação do efeito de pósbiótico de Lactobacillus spp. e  
butirato de sódio contra Pseudomonas aeruginosa. / Lucas  
Rodrigues da Silva; orientador Fabiana Brandão Alves Silva.  
-- Brasília, 2024.  
96 p.

Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) --  
Universidade de Brasília, 2024.

1. Microbiologia. I. Brandão Alves Silva, Fabiana,  
orient. II. Título.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**LUCAS RODRIGUES DA SILVA**

**Título:** Avaliação do efeito de pósbiótico de *Lactobacillus* spp. e butirato de sódio contra *Pseudomonas aeruginosa*.

Dissertação de mestrado apresentada pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.

**Aprovado em: 19 de agosto de 2024**

### BANCA EXAMINADORA

PRESIDENTE:

Profa. Dra. Fabiana Brandão Alves Silva  
Universidade de Brasília (UnB)

MEMBROS:

Profa. Dra. Djane Braz Duarte  
Universidade de Brasília (UnB)

Dra. Fernanda Guilhelmelli Costa  
Secretaria de Educação do Estado de Goiás

Dr. Rodrigo Fonseca Lima (suplente)  
Universidade de Brasília (UnB)

## **DEDICATÓRIA**

*“Cada descoberta nova da ciência é uma porta nova pela qual encontro mais uma vez Deus, o autor dela.”*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer aos meus pais, **Helia Regina** e **Arnaldo Pereira** por todo apoio e suporte desde apoio emocional ao apoio financeiro sem isso não teria conseguido chegar aonde eu cheguei.

Queria agradecer também a minha orientadora, Prof.(a). Dra. **Fabiana Brandão** que me inspirou desde a época de graduação e foi fundamental nessa jornada de mestrado com seus conselhos e ensinamentos que me fizeram evoluir tanto como pessoa como profissional.

Queria agradecer também as minhas amigadas de mestrado que me ajudaram bastante neste período e fez que dias de muito estresse ou cansaço ficasse mais leve com conversas e companheirismo.

Queria agradecer também a Prof.(a) Dra. **Yanna Nóbrega** por conceder o espaço do Laboratório e abrir as portas para que eu pudesse participar desse projeto maravilhoso.

Agradecer aos demais professores que passaram nessa trajetória e foram de suma importância nesse fortalecimento profissional.

Agradecer também aos que duvidaram da minha capacidade, porque isso também serviu de combustível para que eu mostrasse minha verdadeira força de vontade.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Mecanismos de resistência antimicrobiana em *P. aeruginosa*.

**Figura 2:** Pré-bióticos, pró-bióticos, pós-bióticos e simbióticos

**Figura 3:** Esquema prático da metodologia empregada nos ensaios de Concentração Mínima Inibitória.

**Figura 4:** Esquema da placa de 96 poços representando o planejamento do experimento com pós-bióticos.

**Figura 5:** Esquema da placa de 96 poços representando o planejamento do experimento com NaBut.

**Figura 6:** Análise do viés dos meios sobre o crescimento de *P. aeruginosa*. Meios de cultivo Mueller Hinton e MRS combinados e separadamente.

**Figura 7:** Efeito dos pós-bióticos de *L. reuteri* sobre o crescimento de *P. aeruginosa*.

**Figura 8:** Desvio padrão representando o grau de variação, entre as réplicas biológicas, do efeito dose-dependente dos pós-bióticos de *L. reuteri* sobre o crescimento de *P. aeruginosa*.

**Figura 9:** Efeito dos pós-bióticos de *L. rhamnosus* sobre o crescimento de *P. aeruginosa*.

**Figura 10:** Desvio padrão representando o grau de variação, entre as réplicas biológicas, do efeito dose-dependente dos pós-bióticos de *L. rhamnosus* sobre o crescimento de *P. aeruginosa*.

**Figura 11:** Efeito do NaBut sobre o crescimento de *P. aeruginosa*, 1ª placa.

**Figura 12:** Efeito do NaBut sobre o crescimento de *P. aeruginosa*, 2ª placa.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>ATP</b>	Adenosina Trifosfato
<b>BRCAS</b>	Comitê Brasileiro de Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos
<b>CIM</b>	Concentração Inibitória Mínima
<b>LACEN</b>	Laboratório Central de Saúde Pública
<b>MH</b>	Mueller Hinton
<b>MRS</b>	Man, Rogosa e Sharpe
<b>NaBut</b>	Butirato de sódio
<b>OD</b>	Densidade Óptica
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>RPM</b>	Rotações Por Minuto
<b>SCFAs</b>	Short Chain Fatty Acids
<b>UTI</b>	Unidade de Terapia Intensiva
<b>UFC</b>	Unidade Formadora de Colônia

## ÓRGÃOS FINANCIADORES

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia e Imunologia Clínica (LabMIC), localizado na Unidade de Laboratórios de Ensino de Graduação (ULEG/FS) na Faculdade de Saúde – FS da Universidade de Brasília – UNB, Brasília – DF. Foram empregados recursos providos de auxílios financeiros proveniente do FM/NMT/PPG, cujo SEI dos Processo Seletivo do Beneficiário: **23106.116857/2022-81** e **23106.128958/2022-03** e constando o apoio de bolsa de estudo cedida pela Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES).

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
1.1 A problemática da resistência antimicrobiana para saúde mundial.	15
1.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> — biologia e virulência	17
1.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> — meios de cultura	18
1.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> — mecanismos de resistência.	18
1.5 <i>P. aeruginosa</i> — aspectos epidemiológicos	20
1.5.1 Infecções relacionadas à assistência e sua relação com <i>P. aeruginosa</i>	20
1.5.2 Dados epidemiológicos no Brasil	21
1.6 A microbiota intestinal e seu potencial para novas abordagens terapêuticas não-medicamentosas	22
1.6.1 Pré-bióticos	22
1.6.2 Pró-bióticos	23
1.6.3 Pós-bióticos	24
1.7 Butirato de Sódio	26
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	<b>28</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>29</b>
3.1 Objetivo Geral	29
3.2 Objetivos Específicos	29
<b>4. METODOLOGIA</b>	<b>30</b>
4.1 Origem, isolamento e manutenção das Linhagens.	30
4.2 Estoque e Manutenção de inóculos	30
4.3 Meios de cultivo e inóculos	31
4.4 Reagentes e soluções.	32
4.5 Ensaio de Concentração Inibitória Mínima (CIM).	32
4.6 Confecção da Placa – Concentração Mínima Inibitória (CIM).	33
4.6.1 – Preparação dos Pós-bióticos de <i>L. reuteri</i> e <i>L. rhamnosus</i>	33
4.6.2 – Semeio de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	33
4.6.3 – Ajuste de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> na escala de MacFarland.	33
4.6.4 – Planejamento e execução das placas dos pós-bióticos de <i>Lactobacillus</i> spp.	34
4.6.5 — Planejamento e execução das placas de NaBut.	36
4.7 — Leitura das placas por espectrofotometria	38
4.8 — Gráficos e Estatística	38
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>40</b>
5.1 — Análise do efeito dos meios sobre o crescimento de <i>P. aeruginosa</i>	40
5.2 — Testes CIM para <i>P. aeruginosa</i> : pós-bióticos de <i>L. reuteri</i> .	41
5.3 Testes CIM para <i>P. aeruginosa</i> — Pós-bióticos de <i>L. rhamnosus</i> .	43
5.4 Testes CIM para <i>P. aeruginosa</i> — NaBut.	46
<b>6. DISCUSSÃO</b>	<b>49</b>
6.1 <i>Lactobacillus</i> sp. & Pós-bióticos	49
6.2 Análise do efeito dos pós-bióticos sobre crescimento <i>in vitro</i> de <i>P. aeruginosa</i>	51
6.3 Atividade antimicrobiana dos pós-bióticos de <i>Lactobacillus</i> spp.	52
6.4 Efeito do Butirato de sódio sobre o crescimento de patógenos humanos.	53

6.5 Vantagens dos Pós-bióticos sobre Pró-bióticos:	54
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO</b>	<b>56</b>
<b>8. REFERÊNCIAS</b>	<b>58</b>
<b>9. APÊNDICES - Artigo publicado durante o mestrado</b>	<b>66</b>

## RESUMO

**Introdução:** A incidência de infecções causadas por bactérias multirresistentes atingiu níveis alarmantes globalmente. A emergência da resistência antimicrobiana tornou-se ainda mais evidente durante a pandemia de COVID-19, devido ao uso indiscriminado de antibióticos, recrudescimento de doenças negligenciadas e aumento de infecções bacterianas secundárias, como as causadas por *Pseudomonas aeruginosa*. Esta bactéria é classificada como um patógeno de prioridade pela Organização Mundial da Saúde; desenvolve resistência por meio de mutações genéticas e seleção natural devido ao uso de antibióticos, resultando em linhagens multirresistentes. Esse fenômeno leva a falhas terapêuticas e desfechos desfavoráveis em um número crescente de casos. Neste cenário, abordagens não medicamentosas, por terem menor impacto na seleção e resistência, surgem como novas perspectivas terapêuticas. Bactérias do gênero *Lactobacillus* são amplamente empregadas como suplementos probióticos, mas sua colonização a partir da dieta é limitada. Por outro lado, os produtos do metabolismo dos *Lactobacillus* - pós-bióticos - embora ainda pouco explorados na medicina, já demonstraram potencial antimicrobiano. Esse potencial pode ser mais bem explorado no tocante à descolonização de agentes patogênicos, além de evitar a seleção de estirpes multirresistentes. Este estudo objetivou investigar o efeito de pós-bióticos de *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus reuteri* e do sal de butirato de sódio (NaBut) sobre o crescimento de *P. aeruginosa*. **Material e Métodos:** Foram realizadas curvas de crescimento para bactérias seguindo o protocolo de Concentração Inibitória Mínima (CIM), adaptado a partir do BrCAST (Comitê Brasileiro de Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos) para ensaio de microdiluição em caldo. Os *Lactobacillus* spp. foram cultivados por 48 horas a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  no meio de cultura MRS BROTH. Já a linhagem de *P. aeruginosa* passou por pré-cultivo em aerobiose durante 24 horas a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  em meio Mueller Hinton (MH) BROTH. Os pós-bióticos foram obtidos a partir de culturas puras e frescas de *Lactobacillus* spp.. Os meios para os ensaios de CIM foram preparados com MH BROTH acrescido dos pós-bióticos específicos de espécie (v/v) de *L. rhamnosus* e *L. reuteri*, ou de concentrações iniciais de 50 mM de NaBut. **Resultados:** Os resultados demonstram redução no crescimento de *P. aeruginosa* na presença do pós-biótico de *L. reuteri* da ordem de **92,89%** na concentração de 50% v/v, redução de **75,07%** na concentração de 25% v/v, e de **52,32%** na concentração de 12,5% v/v. Já para o pós-biótico de *L. rhamnosus* também foi observado redução do crescimento, porém discretamente menor, sendo de **92,73%** na concentração de 50% v/v e **70,34%** na concentração de 25% v/v, as demais concentrações ficaram com redução abaixo de 40%. Para os testes empregando NaBut, fazendo uma média geral do Nabut, ocorreu inibição de *P. aeruginosa* de **48,4%** na concentração de 50 mM (poço 1), na concentração de 25 mM (poço 2) houve redução de **35,35%** no crescimento, concentração de 12,5 mM (poço 3) houve redução de **18,15%**, na concentração de 6,25 mM (poço 4) houve redução de **8,9%**. **Conclusão:** Tanto os pós-bióticos de *Lactobacillus* spp. quanto o NaBut conseguiram reduzir o crescimento *in vitro* de *P. aeruginosa* de modo dose-dependente. É importante destacar que os dados apresentados são iniciais e carecem de estudos complementares para identificar as possíveis moléculas responsáveis pela observação. Entretanto, os dados preliminares indicam que os pós-bióticos têm efeito inibitório sobre bactérias patogênicas e poderão, no

futuro, serem empregados como abordagem complementar aos tratamentos clínicos. Além de terem menor impacto na seleção de linhagens resistentes, os pós-bióticos se destacam pela economicidade e pela possibilidade de serem oferecidos em regiões parcimoniosamente vulneráveis.

**Palavras-chave;** *Lactobacillus*; pós-biótico; resistência antimicrobiana; butirato de sódio; *Pseudomonas aeruginosa*.

## ABSTRACT

**Introduction:** The incidence of infections caused by multidrug-resistant bacteria has reached alarming levels globally. The emergence of antimicrobial resistance became even more evident during the COVID-19 pandemic due to the indiscriminate use of antibiotics, the resurgence of neglected diseases, and the increase in secondary bacterial infections, such as those caused by *Pseudomonas aeruginosa*. This bacterium is classified as a priority pathogen by the World Health Organization and develops resistance through genetic mutations and natural selection due to antibiotic usage, resulting in multidrug-resistant strains. This phenomenon leads to therapeutic failures and unfavorable outcomes in an increasing number of cases. In this context, non-pharmacological approaches, which have a lower impact on selection and resistance, emerge as new therapeutic perspectives. Bacteria of the genus *Lactobacillus* are widely used as probiotic supplements, but their dietary colonization is limited. Conversely, the metabolic products of *Lactobacillus*—postbiotics—although still underexplored in medicine, have already demonstrated antimicrobial potential. This potential can be further investigated concerning the decolonization of pathogenic agents and the prevention of the selection of multidrug-resistant strains. This study aimed to investigate the effect of postbiotics from *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus reuteri*, as well as sodium butyrate (NaBut), on the growth of *P. aeruginosa*. **Materials and Methods:** Growth curves for the bacteria were conducted following the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) protocol, adapted from BrCAST (Brazilian Committee on Antimicrobial Sensitivity Testing) for broth microdilution assays. The *Lactobacillus* spp. were cultivated for 48 hours at  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  in MRS broth. The *P. aeruginosa* strain underwent pre-cultivation in aerobic conditions for 24 hours at  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  in Mueller Hinton (MH) broth. Postbiotics were obtained from fresh, pure cultures of *Lactobacillus* spp. The media for the MIC assays were prepared using MH broth supplemented with specific postbiotics (v/v) from *L. rhamnosus* and *L. reuteri*, or with initial concentrations of 50 mM of NaBut. **Results:** The results demonstrate a reduction in the growth of *P. aeruginosa* in the presence of the postbiotic from *L. reuteri* of 92.89% at a concentration of 50% v/v, 75.07% at 25% v/v, and 52.32% at 12.5% v/v. For the postbiotic from *L. rhamnosus*, a reduction in growth was also observed, although slightly lower, with 92.73% at 50% v/v and 70.34% at 25% v/v; the other concentrations showed reductions below 40%. In tests using NaBut, an average overall inhibition of *P. aeruginosa* was observed at 48.4% at 50 mM (well 1), with a reduction of 35.35% at 25 mM (well 2), 18.15% at 12.5 mM (well 3), and 8.9% at 6.25 mM (well 4). **Conclusion:** Both postbiotics from *Lactobacillus* spp. and NaBut were able to reduce the in vitro growth of *P. aeruginosa* in a dose-dependent manner. It is important to emphasize that the presented data are preliminary and require further studies to identify the potential molecules responsible for the observed effects. However, the preliminary data indicate that postbiotics exhibit inhibitory effects on pathogenic bacteria and may, in the future, be employed as a complementary approach to clinical treatments. In addition to having a lower impact on the selection of resistant strains, postbiotics stand out for their cost-effectiveness and potential availability in resource-limited regions.

**Keywords;** *Lactobacillus*; postbiotics; antimicrobial resistance; sodium butyrate; *Pseudomonas aeruginosa*.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 A problemática da resistência antimicrobiana para saúde mundial.

A área da Medicina passou por uma transformação significativa com a introdução dos antimicrobianos, representando um notável avanço no cenário biotecnológico. Esta inovação propiciou a preservação de inúmeras vidas ao confrontar infecções anteriormente concebidas como potencialmente letais. Simultaneamente, promoveu melhorias substanciais na qualidade de vida de milhões de indivíduos afetados por essas enfermidades. O tratamento farmacológico, uma vez iniciado, demonstra eficácia na redução dos sintomas a curto prazo, contrapondo-se aos efeitos prejudiciais dos patógenos (“RESISTÊNCIA BACTERIANA PELO USO INDISCRIMINADO DE ANTIBIÓTICOS: UMA QUESTÃO DE SAÚDE PÚBLICA”, 2020).

No entanto, as crescentes práticas indiscriminadas no uso de antimicrobianos geram prejuízos que superam os benefícios— o risco é maior que o benefício —, resultando na aceleração de processos de seleção natural que conduzem à emergência de resistência aos medicamentos. A resistência bacteriana, nesse contexto, configura-se como uma ameaça substancial à eficácia desses agentes farmacológicos. Este fenômeno é caracterizado pela habilidade dos micro-organismos em contornar as condições microbicidas propostas, demonstrando uma capacidade singular de sobreviver às concentrações dos fármacos que, teoricamente, deveriam ser eficientes contra organismos da mesma espécie (ALÓS, 2015).

A resistência aos antibióticos pode ser conceituada como um fenômeno de adaptação dos micro-organismos, resultante de mutações genéticas ou da aquisição de genes de resistência, conferindo-lhes a capacidade de sobreviver à exposição a agentes farmacológicos. Essas alterações podem manifestar-se por meio de modificações no sítio de ação do fármaco, culminando na inativação ou obstrução, fruto da incorporação de genes de resistência (RODRÍGUEZ-SANTIAGO et al., 2021).

Enquanto o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos é um processo moroso devido à sua intrincada complexidade, a evolução do mecanismo de resistência ocorre de maneira acelerada, destacando a imperiosa

necessidade de priorizar investigações direcionadas ao enfrentamento desse desafio premente (CAMACHO SILVAS, 2023).

As infecções multirresistentes são reconhecidas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma séria preocupação global, face ao crescimento alarmante no número de casos clínicos e ao aumento da ineficácia dos tratamentos farmacológicos. A OMS projeta um incremento substancial na resistência bacteriana a curto prazo. Atualmente, infecções resistentes a medicamentos já ocasionam pelo menos 700.000 óbitos anuais, incluindo 230.000 decorrentes de tuberculose multirresistente. Em um prognóstico mais sombrio, na ausência de intervenções, estima-se cerca de 10 milhões de mortes anuais até 2050, com 2,4 milhões previstos em países de alta renda entre 2015 e 2050 (INTERAGENCY COORDINATION GROUP ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE, 2019).

Um dos principais catalisadores desse cenário preocupante, se não o principal, é a prática do uso empírico de antibióticos, desprovido de embasamento em evidências científicas. A OMS posiciona a resistência aos antimicrobianos como uma das principais ameaças à saúde global (ANTIBIOTIC RESISTANCE THREATS IN THE UNITED STATES, 2019; ANVISA, 2022).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) enfatiza que o incremento na resistência aos antimicrobianos acarreta danos significativos à saúde populacional, refletidos por infecções notórias que comprometem o quadro clínico do paciente, especialmente aqueles imunodeprimidos ou submetidos a procedimentos hospitalares. Tais infecções oportunistas proliferam no ambiente hospitalar, aumentando a morbimortalidade, demandando maior atenção da equipe médica e ensejando o uso de alternativas antimicrobianas mais dispendiosas (ANVISA, 2022; YUKI MURAI et al., 2022).

A pandemia da COVID-19 emerge como um coadjuvante relevante no agravamento da resistência aos antibióticos. A disseminação de desinformação pela internet estimulou o uso indiscriminado de diversos fármacos pela população, incluindo antibióticos, desprovidos de fundamentação científica. Um estudo no Distrito Federal, focalizando a resistência antimicrobiana em indivíduos com mais de 70 anos, revelou que 50% dos entrevistados

apresentaram orientação inadequada e relataram uso inapropriado de antibióticos. Dentre esses, 15% mencionaram ter sido acometidos por microorganismos resistentes, e 9,1% afirmaram ter utilizado antibióticos para tratar o vírus responsável pela COVID-19. (GALVÃO, ANNA LUIZA ZAPALOWSKI et al., 2023).

## 1.2 *Pseudomonas aeruginosa* — biologia e virulência

*Pseudomonas aeruginosa* é classificada como um patógeno de prioridade um pela Organização Mundial da Saúde, e novos medicamentos são urgentemente necessários devido ao surgimento de cepas multirresistentes (MDR).

*P. aeruginosa* é um bacilo gram-negativo aeróbico e não fermentador da glicose, não produz esporos e é um microrganismo ubíquo, amplamente distribuído em vários nichos ecológicos, destacando-se por sua notável versatilidade metabólica, que lhe permite prosperar tanto em ambientes aquáticos quanto terrestres. *P. aeruginosa* evidencia a habilidade de colonizar diversidade de fontes de vida, incluindo plantas, animais e seres humanos (BOTELHO; GROSSO; PEIXE, 2019).

Com relação à capacidade patogênica, *P. aeruginosa* apresenta atributos de virulência importantes, como: motilidade, invasinas, adesinas, toxinas e propriedades antifagocitárias. A motilidade se divide em 3 tipos, *swarming*, *swimming* e *twitching*. As invasinas, como a protease alcalina, auxiliam na capacidade antifagocitária e na degradação de proteínas do hospedeiro (SAEKI et al., 2020). Às fímbrias atuam como adesinas, e as toxinas exoenzima S e exotoxina A promovem dano tecidual e escape fagocitário (AZAM; KHAN, 2019).

Dentre os atributos de virulência mais relevantes se destaca o potencial de formação de biofilmes. Biofilmes são produzidos por microrganismos que se desenvolvem em estruturas “agregadas”, habitualmente em superfícies bióticas ou abióticas, “embebidos” em uma matriz tridimensional composta por substâncias poliméricas extracelulares (EPS), sintetizadas pelo próprio microrganismo (JACOB-LOPES et al., 2014; SANT’ANA et al., 2003). *P. aeruginosa*

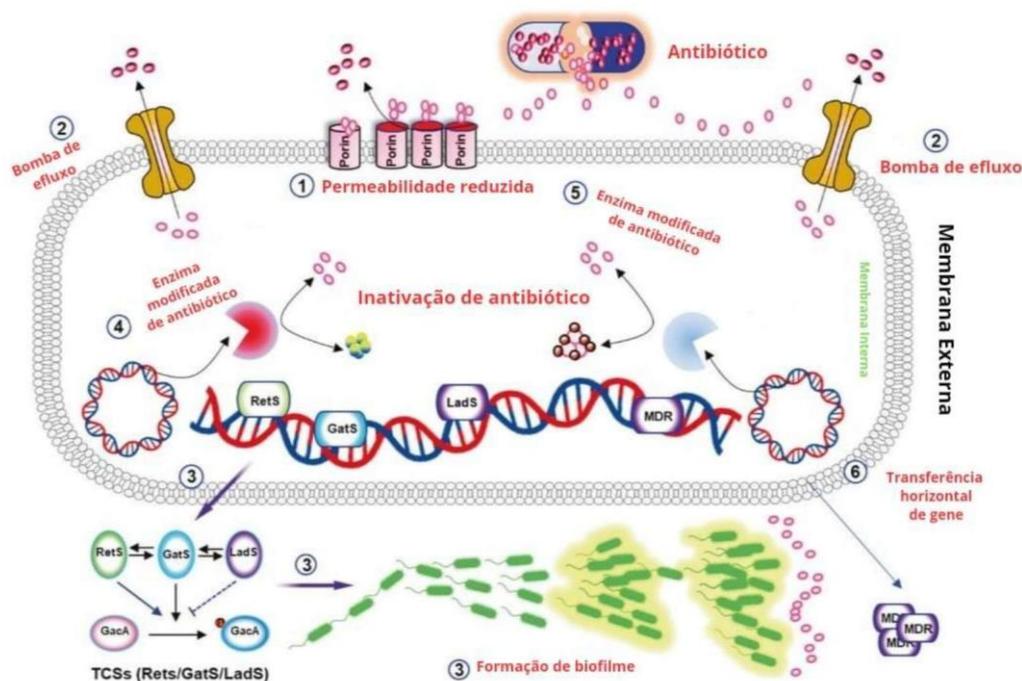
demonstra um notável potencial para a formação de biofilmes. Esses biofilmes são uma ameaça significativa em infecções nosocomiais, dificultando o tratamento com antimicrobianos convencionais (Mahmmudi & Gorzin, 2017). Os biofilmes de *P. aeruginosa* são mais difíceis de tratar e levam a falha terapêutica, por exibirem uma tolerância intrínseca aos antibióticos, bem como o desenvolvimento de resistência mutacional (Ciofu & Tolker-Nielsen, 2019).

### **1.3 *Pseudomonas aeruginosa* — meios de cultura**

Os meios de cultura nos quais essa bactéria cresce são os mais variados, pois não exige tanto no aspecto nutricional. Entretanto, o microrganismo cresce, por exemplo, nos meios ágar Sangue com colônias irregulares e com produção de véu, ágar MacConkey— meio seletivo para bactérias gram-negativas—, e Meio CLED —meio para diferenciação de microrganismos da urina. A presença de *P. aeruginosa* nesse meio é conferida por suas colônias nas tonalidades verdes. Também cresce em outros meios (ANVISA, 2004).

### **1.4 *Pseudomonas aeruginosa* — mecanismos de resistência.**

*P. aeruginosa* exibe resistência a diferentes classes de antibióticos, incluindo aminoglicosídeos, quinolonas e  $\beta$ -lactâmicos (**Figura 1**). Dentre os antibióticos de uso clínico vale citar a resistência intrínseca às cefalosporinas de 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> gerações, ampicilina e ertapenem (Santos & Lauria Pires, 2010; Rodríguez- Baño et al., 2018; DE OLIVEIRA et al., 2020; JEAN; HARNOD; HSUEH, 2022; DE SOUSA et al., 2021).



**Figura 1: Mecanismos de resistência antimicrobiana em *P. aeruginosa*.**

Fonte: Modificado de QIN et al., 2022

Alguns dos mecanismos que geram resistências já foram elucidados, como a resistência aos carbapenêmicos, que se dá mediante expressão de genes que codificam uma enzima produtora de metalo-beta-lactamase, resultando em tratamentos ainda mais difíceis (DE OLIVEIRA et al., 2020; DE SOUSA et al., 2021; JEAN; HARNOD; HSUEH, 2022;). No geral, os principais mecanismos de resistência podem ser agrupados em mecanismos intrínsecos, adquiridos e adaptativos (HANCOCK; SPEERT, 2000, Breidenstein et al., 2011).

A resistência intrínseca e/ou adquirida envolve variados fatores, como alteração da permeabilidade da membrana, hiper expressão de sistema de efluxo e síntese de proteínas de ligação e inativação das penicilinas por meio de ligação ao anel  $\beta$ - lactâmico (QUARESMA et al., 2009). *P. aeruginosa* é ainda capaz de existir simultaneamente todos esses fatores (STRATEVA; YORDANOV, 2009). A resistência adquirida ocorre por transferência horizontal de genes de resistência ou mutações (BREIDENSTEIN; DE LA FUENTE-NÚÑEZ; HANCOCK, 2011). Todavia, a resistência adquirida pode ser impulsionada em respostas a substâncias antimicrobianas (AZAM; KHAN, 2019).

A resistência adaptativa inclui a formação de biofilme nos pulmões de pacientes infectados, atuando como barreira à difusão de antibióticos

(DRENKARD, 2003). Além disso, células persistentes, tolerantes a múltiplos medicamentos, podem surgir no biofilme, sendo responsáveis por infecções prolongadas e recorrentes em pacientes com fibrose cística (MULCAHY et al., 2010).

No Brasil, devido ao exacerbado número de surtos e aumento da mortalidade, os órgãos de vigilância sanitária propõem que haja rastreio e controle desses perfis de resistência (ANVISA, 2021; SILVA; ESTEVAM; NOGUEIRA, 2024).

### **1.5 *P. aeruginosa* — aspectos epidemiológicos**

No tocante aos aspectos epidemiológicos, um panorama atualizado das infecções ocasionadas por *P. aeruginosa* são alarmantes. No Brasil, *P. aeruginosa* vem sendo importante causador de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRA), sendo considerado o patógeno mais prevalente associado a pneumonia e o terceiro em infecção primária da corrente sanguínea em unidades de terapia intensiva (UTI) (ELMER WILLIAM KONEMAN et al., 2008; FIGUEREDO et al., 2021).

#### *1.5.1 Infecções relacionadas à assistência e sua relação com P. aeruginosa*

As infecções relacionadas à assistência à saúde (IRA) representam uma preocupação substancial no âmbito da saúde pública mundial. IRA induzem a elevação significativa da morbidade e mortalidade entre os pacientes, desencadeando repercussões sociais adversas nos sistemas de saúde de distintas nações e territórios (SANT'ANA et al., 2003; OLIVEIRA; BUSTAMANTE; BESEN, 2022).

Neste contexto, destacam-se os microrganismos multirresistentes como *P. aeruginosa*, que ocasionam significativas complicações na terapêutica, principalmente de indivíduos imunossuprimidos (ESCOLÀ-VERGÉ; LOS-ARCOS; ALMIRANTE, 2020) (FIGUEREDO et al., 2021). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), *P. aeruginosa* é um dos microrganismos de alerta se tratando de resistência e novas abordagens terapêuticas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2024). É notória a persistência desta bactéria em

ambientes clínicos, dada sua extraordinária plasticidade adaptativa e variado perfil de resistência aos antibióticos. *P. aeruginosa* é frequentemente associada a IRAS como pneumonia, infecções do trato urinário e bacteremia, principalmente em pacientes imunocomprometidos (SKARIYACHAN et al., 2018).

Atualmente, essa bactéria é considerada a principal causa de pneumonia associada à ventilação mecânica nas Unidades de Tratamento Intensivo (UTI) (LIMA et al., 2017). É também o micro-organismo mais prevalente em pacientes com fibrose cística (MAINZ et al., 2019). Essa bactéria é também um indicador de contaminação de águas minerais (SANT'ANA et al., 2003). Infecções nosocomiais como pneumonia, infecções do trato urinário e bacteremia estão frequentemente relacionadas a esse patógeno, principalmente em pacientes imunocomprometidos (SKARIYACHAN et al., 2018).

#### *1.5.2 Dados epidemiológicos no Brasil*

Em Unidade de Terapia Intensiva para adultos (UTI adulto), *P. aeruginosa* demonstrou ser o 5º principal microrganismo em infecções primárias de corrente sanguínea confirmada laboratorial (IPCSL). Entretanto, em infecções do trato urinário associada a cateter vesical de demora (ITU-AC) demonstrou ser o 2º principal micro-organismo. Em UTI pediátrica demonstrou ser 9º em IPCSL e 3º em ITU-AC. Em IPCSL em UTI neonatal é o 11º micro-organismo mais prevalente. (SECRETARIA DE SAÚDE DO GOVERNO FEDERAL (SES), Relatório GRSS n°04-2020 - Análise RM - IRAS 2019.)

Ainda, em UTI adulto, *P. aeruginosa* corresponde a 63,3% da resistência aos carbapenêmicos em pacientes com IPCSL e 63,6% em pacientes com ITU-AC, mas não apresentaram resistência à polimixina. Nas UTI pediátricas, tanto em pacientes com IPCSL quanto ITU-AC, não demonstrou resistência para os carbapenêmicos e polimixinas. Em UTI neonatal apresentou 33,3% de resistência aos carbapenêmicos e não apresentou resistência à polimixina. (SECRETARIA DE SAÚDE DO GOVERNO FEDERAL (SES), Relatório GRSS n°04-2020 - Análise RM - IRAS 2019.)

## 1.6 A microbiota intestinal e seu potencial para novas abordagens terapêuticas não-medicamentosas

A microbiota intestinal é um sistema complexo constituído por milhões de microrganismos e modulada por seus produtos. Há estimativas de que a microbiota intestinal humana possui cerca de 150 vezes mais genes do que todo o genoma humano (WANG et al., 2017). A microbiota intestinal também tem sido caracterizada como um ecossistema vital que conecta com outro órgão, como, por exemplo, o sistema nervoso (HONARPISHEH; BRYAN; MCCULLOUGH, 2022). Quando em equilíbrio na sua composição— microrganismos não-patogênicos em maiores números que os patogênicos—, o hospedeiro se beneficia desta relação simbiótica, particularmente no desenvolvimento do sistema imunitário, além da melhora na função de barreira contra agentes patogênicos (AFZAAL et al., 2022).

Neste contexto, um grupo importante de microrganismos e seus produtos metabólicos vêm sendo alvo de diferentes estudos mundialmente, os **pró-bióticos**. Consensualmente, pró-bióticos são aceitos como agentes que promovem a saúde do hospedeiro. Mais recentemente, os metabólitos oriundos desses microrganismos, denominados **pós-bióticos**, também têm sido objeto de interesse. Estudos desses compostos bioativos parecem atuar na modulação da microbiota do hospedeiro, no sistema imunitário e sobre crescimento e colonização de outras espécies patogênicas.

### 1.6.1 Pré-bióticos

Por definição, pré-bióticos 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. A atividade metabólica inter e intra reinos/classes, contribui influenciando no desenvolvimento e modulação do sistema imunológico, evitando a colonização de patógenos no intestino (ZHENG; LIWINSKI; ELINAV, 2020).

### 1.6.2 Pró-bióticos

Os pró-bióticos são microrganismos que, quando presentes no organismo em quantidades proporcionais, promovem defesa e melhoria na resposta imunitária (HILL et al., 2014). Bactérias do gênero *Lactobacillus* são amplamente empregadas como suplementos alimentares pró-bióticos. Diferentes estudos comprovaram que a presença de pró-bióticos na mucosa intestinal promove melhor resposta do sistema imunológico frente a microrganismos patogênicos invasores ou oportunistas, além de promoverem melhora na permeabilidade intestinal (SAAD, 2006; FAN; PEDERSEN, 2020).

Os pró-bióticos também tem sua segurança comprovada em uso pediátrico. Estudos apontam a habilidade em manter a homeostasia benéfica ao hospedeiro, incluindo a indicação do uso de pró-bióticos para evitar dermatites e concomitante ao uso de antibióticos, uma abordagem que reduz significativamente o risco de diarreia aguda (SZAJEWSKA et al., 2014).

No grupo de pró-bióticos, os microrganismos mais estudados e com dados de segurança e uso clínico, destacam-se os *Lactobacillus*.

Beijerinck propôs o gênero *Lactobacillus* em 1901, abrangendo microrganismos gram-positivos, fermentativos, anaeróbios facultativos e não produtores de esporos. Este gênero está categorizado no filo Firmicutes, na classe Bacilli, na ordem *Lactobacillales* e na família *Lactobacillaceae*, que engloba os gêneros *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* e *Pediococcus* (ZHENG et al., 2020).

Os efeitos dos *Lactobacillus* como imunomoduladores já são conhecidos (WILSON; WALKER; YIN, 2021). Esses efeitos podem ser originados por uma multiplicidade de fatores. Estudos empregando *Lactobacillus pentosus* b240, inativado pelo calor, promoveu a produção de imunoglobulinas, do interferon (IFN)- $\gamma$  e do fator de necrose tumoral, mas não IL-4, IL-5, fatores de ativação de células B, IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  e fator de transformação de crescimento- $\beta$ 1 (SHINKAI et al., 2012).

Interessantemente, a cepa *Lactobacillus plantarum* YYC-3 foi capaz de inibir linhagens celulares de câncer colorretal humano HT-29 e Caco2 ao

modular o sistema imunológico, reduzindo a expressão das citocinas inflamatórias IL-6, IL-17 e IL-22, além de diminuir a infiltração de células inflamatórias (YUE et al., 2020).

### 1.6.3 Pós-bióticos

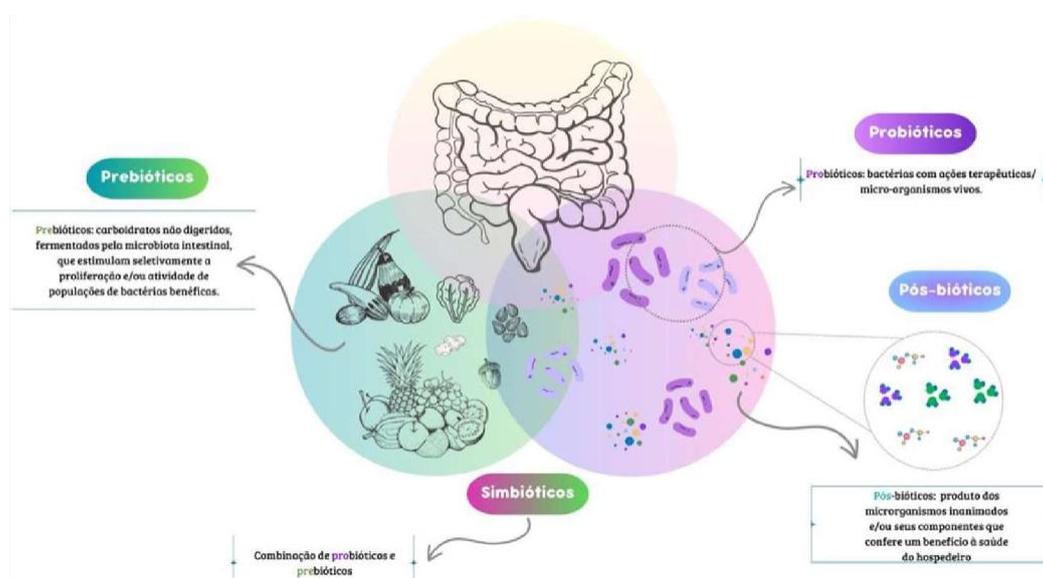
Pós-bióticos são produtos provenientes de microrganismo considerados benéficos —*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Eubacterium*, *Faecalibacterium*, e *Saccharomyces* —, por meio dos seus processos metabólicos (SANGILYANDI GURUNATHAN; PRATHEEP THANGARAJ; KIM, 2023). São naturalmente encontrados em alimentos fermentados, como iogurte, chucrute, vegetais em conserva e kombucha (AGUILAR-TOALÁ et al., 2018).

A determinação de pós-bióticos em suplementos dietéticos e produtos alimentares é regulada pela Farmacopeia Europeia, que os classifica como "produtos de bactérias vivas e intactas, esporos ou cultura de microrganismos", principalmente linhagens bacterianas e fúngicas identificadas como GRAS (Generally Recognized as Safe). Conforme dados publicados pela Food and Agriculture Organization of the United Nations–World Health Organization (FAO/WHO), os pós-bióticos, como o ácido láctico, foram classificados como "metabólitos típicos e característicos" produzidos, por exemplo, por *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus paracasei* (O'TOOLE; MARCHESI; HILL, 2017).

Englobam um vasto grupo de moléculas que incluem ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs - *Short Chain Fatty Acids*), proteínas (por exemplo, enzimas, bacteriocinas), peptídeos, lipídeos, hidratos de carbono (por exemplo, exopolissacáridos), poliaminas, ácidos teicóicos, vitaminas, nucleosídeos e outros ácidos orgânicos, substâncias inorgânicas (por exemplo, CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e componentes de dimensão micrónica (por exemplo, vesículas membranares). Os pós-bióticos são considerados seguros para bebês, crianças e adultos, proporcionando benefícios para a saúde nestas fases da vida (SANGILYANDI GURUNATHAN; PRATHEEP THANGARAJ; KIM, 2023; CUEVAS-GONZÁLEZ; LICEAGA; AGUILAR-TOALÁ, 2020).

Os pós-bióticos são descritos como “compostos seguros que não são afetados pelo processo de pasteurização”, podendo serem ingeridos e utilizados em diferentes aplicações, como nas indústrias alimentar, farmacêutica e

cosmética. Entretanto, técnicas de processamento, incluindo calor, sonicação, irradiação e alta pressão, podem impactar a composição dos pós-bióticos (SANGILYANDI GURUNATHAN; PRATHEEP THANGARAJ; KIM, 2023). O processo de extração, padronização, transporte e armazenamento de pós-bióticos é mais simples que dos pró-bióticos, que carecem serem mantidos viáveis para uso. Técnicas de bioengenharia, como tecnologia de fermentação e alta pressão, podem ser usadas para a síntese de diferentes pós-bióticos (AGGARWAL et al., 2022). No entanto, este conceito relativamente recente de pós-bióticos é, por vezes, controverso, na maioria devido à diversidade de determinadas biomoléculas e ao fato de surgirem como produtos finais de diferentes processos, contribuindo, conseqüentemente, para vários efeitos no hospedeiro.



**Figura 2: Pré-bióticos, pró-bióticos, pós-bióticos e simbióticos.**

Fonte: Torquati Madeira Costa, 2024.

Essas substâncias vêm sendo estudadas no ramo da ciência por conta da sua promissora capacidade de uso em determinadas áreas da saúde humana (PRAJAPATI et al., 2023). Entre os benefícios proporcionados pelos pós-bióticos, destacam-se os efeitos diretos, os quais resultam da interação dessas substâncias com as células do hospedeiro onde foram administrados. Tais efeitos diretos podem manifestar-se por meio de modulações específicas em vias metabólicas celulares ou pela regulação de processos fisiológicos intrínsecos.

Adicionalmente, observam-se benefícios indiretos decorrentes da ação dos pós-bióticos, tais como a promoção da proliferação de microrganismos benéficos à saúde. Esse fenômeno contribui para o equilíbrio da microbiota, favorecendo a composição de uma comunidade microbiana diversificada e propícia ao bem-estar do hospedeiro (MARTYNIK et al., 2021).

Apesar do número significativo de estudos que descrevem a produção e a eficácia dos pós-bióticos como estratégias antimicrobianas promissoras, a utilização de pós-bióticos como abordagem auxiliar em infecção pulmonar polimicrobiana, por exemplo, as causadas por *P. aeruginosa*, carece de investigação.

### 1.7 Butirato de Sódio

O Butirato é um ácido graxo de cadeia curta (AGCC) produzido a partir da fermentação de bactérias pró-bióticas—Bacteroides e Firmicutes presentes no cólon —, a partir de fibra alimentar não digerida (FURUSAWA et al., 2013; KIM et al., 2018). O Butirato apresenta propriedades anti-inflamatórias e anticancerígenas (AGGARWAL et al., 2022), além de seu papel como modulador epigenético em fungos patogênicos (BRANDÃO et al., 2015).

Interessantemente, a combinação de Butirato de sódio com os pró-bióticos *Lactobacillus* sp., parece aumentar o papel protetor desta substância. No estudo realizado por Wang e colaboradores (2018), foi constatado que a sinergia entre bactérias capazes de produzir butirato, como o *Clostridium butyricum*, juntamente com o *Lactobacillus acidophilus*, amplificou significativamente a atividade anti-inflamatória do Butirato. Tal achado permite hipotetizar que a combinação entre Butirato e espécies de *Lactobacillus* sp. poderia beneficiar até mesmo contra processos infecciosos causados por microrganismos residentes, oportunistas ou invasores.

Neste sentido, os estudos empregando pró-bióticos, pré-bióticos e pós-bióticos podem ser uma “chave” para melhor compreender como se dá interações entre microrganismos no ecossistema denominado microbiota. A relação simbiótica entre esses componentes da microbiota intestinal pode ser

essencial para proporcionar benefícios e sustentar o equilíbrio do ecossistema, fortalecendo a microbiota para que, diante de invasores patogênicos, a resposta imunológica do hospedeiro seja mais seletiva e eficiente (KIM et al., 2019; FERNANDES; RODRIGUES; SOUZA, 2021; PEIVASTEHR-ROUDSARI et al., 2020).

## 2. JUSTIFICATIVA

A resistência antimicrobiana representa uma preocupação significativa nas infecções causadas pela *P. aeruginosa*, dada a sua extraordinária capacidade de resistência por mecanismos intrínsecos, adquiridos e adaptativos; destacando a necessidade de estratégias de controle que melhorem a eficácia do tratamento.

Uma das vertentes que tenta combater o avanço da resistência microbiana objetiva estudar abordagens coadjuvantes, com menor impacto sobre seleção de linhagens multirresistentes, além de menor toxicidade ao paciente. Neste sentido, há um avanço em estudos com pró-bióticos e/ou seus pós-bióticos, dada suas capacidades em inibir/diminuir o crescimento de determinados microrganismos patogênicos, aumentando a barreira de defesa na microbiota intestinal, somado a uma ação moduladora sobre o sistema imunológico.

A vasta maioria dos estudos com *Lactobacillus* spp. empregam seu uso como pró-bióticos, que apresentam como principal limitação a necessidade de serem ingeridos vivos e alcançarem o sítio de atuação ainda viáveis. Por outro lado, o presente estudo investiga o papel de metabólitos excretados no meio por essas bactérias e do NaBut, como agentes **pós-bióticos**, como estão sendo denominados. Trata-se de um conceito novo ainda em fase de discussão pelo ISAPP (Associação Científica Internacional de Pró-bióticos e Pré-bióticos).

Destarte, a proposta deste estudo é avaliar o efeito de pós-bióticos de diferentes espécies de *Lactobacillus* spp., de modo a elucidar o papel desses metabólitos sobre crescimento da bactéria multirresistente *P. aeruginosa*. Há uma expectativa dos dados apontarem para uma possível abordagem terapêutica coadjuvante, com melhor economicidade e, especialmente, com menor impacto sobre seleção de linhagens resistentes significativamente menores que os antimicrobianos atuais.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito de pós-bióticos secretados por *Lactobacillus* spp. e ácidos graxos de cadeia curta presentes na microbiota intestinal, sobre crescimento de *P. aeruginosa*.

#### 3.2 Objetivos Específicos

Avaliar o efeito do pós-biótico de *L. reuteri* sobre crescimento de *P. aeruginosa*;

Avaliar o efeito do pós-biótico de *L. rhamnosus* sobre crescimento de *P. aeruginosa*;

Avaliar o efeito do Butirato de Sódio sobre o crescimento de *P. aeruginosa*;

Determinar a Concentração Inibitória mínima (CIM) do pós-biótico de *L. reuteri* sobre crescimento de *P. aeruginosa*;

Determinar a Concentração Inibitória mínima (CIM) do pós-biótico de *L. rhamnosus* sobre crescimento de *P. aeruginosa*;

Determinar a Concentração Inibitória mínima (CIM) de NaBut sobre o crescimento de *P. aeruginosa*.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Origem, isolamento e manutenção das Linhagens.

A linhagem [ATCC27853](#) de *P. aeruginosa*, gentilmente cedida pelo LACEN (Laboratório Central de Saúde Pública), foi empregada em todos os ensaios deste estudo. Já as linhagens de *Lactobacillus* escolhidas foram: *L. reuteri* (Lote: IE2702) e *L. rhamnosus* (LR-G14) (Lemma®), gentilmente doadas pela Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Yanna Nóbrega, chefe do LabMIC (ULEG/FS-UnB), devidamente mantidas durante a execução deste projeto de mestrado.

Importante citar que as linhagens de *Lactobacillus* spp. provenientes da biblioteca de microrganismos do LABMIC foram, em estudos anteriores, validadas por espectrometria de massa de tempo de voo por ionização de desorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF) no LACEN. Na execução da metodologia de MALDI-TOF, algumas colônias foram aplicadas na lâmina alvo (Biomérieux, Marcy l'Etoile, França) com 0,5 µL de ácido fórmico a 25% e 1 µL de solução de matriz a 3,1% (ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico) (ambos de Biomérieux, Marcy'Etoile, França). Após a secagem, as lâminas foram transferidas para uma estação de leitura Vitek MS® System (Biomérieux, Marcy l'Etoile, França) e os espectros obtidos foram analisados utilizando o banco de dados Vitek MS versão 3.0. Os resultados foram considerados válidos quando a probabilidade percentual de identificação dos valores foi maior ou igual a 99,9%.

### 4.2 Estoque e Manutenção de inóculos

Os estoques bacterianos foram preservados congelados em microtubos contendo meio de cultura Mueller Hinton BROTH (HIMEDIA) para *P.aeruginosa*. Já aos estoques destinados a *L. reuteri* e *L. rhamnosus* foram armazenados em caldo LACTOBACILLI MRS BROTH, marca Acumedia® 29 (Neogen do Brasil, São Paulo, Brasil), com a adição de glicerol. Os estoques de bactérias foram mantidos em meio de cultivo acrescido de glicerol [30%] e congelados a -20 °C.

Inicialmente, para realização dos ensaios, um pré-inóculo era realizado extraindo um volume de 15 µL do estoque de *P. aeruginosa* e inoculado em meio

de cultura Mueller Hinton ágar (MH), incubado em uma estufa de CO<sub>2</sub> (Fanem LTDA.) a uma temperatura de 37°C, sem agitação, por 24 horas. O mesmo procedimento foi realizado para pré-inóculos de *L. reuteri* e *L. rhamnosus*, porém, semeados em caldo MRS e inoculados por 48h em estufa a 37°C, também sem agitação. O propósito era propiciar o crescimento exponencial das amostras destinadas aos testes posteriores. Posteriormente, os cultivos foram mantidos refrigerados por até 10 dias, visando sua preservação para repiques subsequentes.

### 4.3 Meios de cultivo e inóculos

As células de *P. aeruginosa* foram cultivadas previamente em aerobiose durante 18h a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  em meio Mueller Hinton (MH) da marca HIMEDIA, para realização da análise de Concentração inibitória mínima, de acordo protocolo do BrCast ([Comitê Brasileiro de Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos](#)). O meio composto por ácido hidrolisado de caseína e extrato de carne que fornecem aminoácidos, nitrogênio, minerais, vitaminas, carbono e outros nutrientes que suportam o crescimento de *P. aeruginosa*— Muller Hinton: Ingredientes g/L (Infusão de Carne: 300 g/L, Hidrolisado ácido de caseína: 17,5 g/L, Amido: 1,5 g/L, pH final 7,3 a 25 °C).

Para os ensaios de placa de micro-diluição, os pós-bióticos de *Lactobacillus* spp., bem como os meios para cultivo, foram preparados na concentração 1x (padrão recomendado em bula) para os controles, e nos testes CIM (Concentração Inibitória Mínima) na concentração de 2x (o dobro da concentração), devido à adição dos pós-bióticos ao meio de crescimento.

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

#### 4.4 Reagentes e soluções.

Em relação ao preparo dos reagentes, para o Butirato de Sódio (Cayman Chemical®) foi preparada uma solução estoque, e mantida a -20°C sob proteção da luz, a uma concentração de 500 mM (molaridade), diluído com água para injetáveis da marca (ISOFARMA®).

#### 4.5 Ensaio de Concentração Inibitória Mínima (CIM).

Os ensaios propostos para este estudo foram baseados nos protocolos do BRCAS (Comitê Brasileiro de Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos) para ensaio de microdiluição em caldo, com adaptações.

Foram utilizadas placas de 96 poços de fundo chato, contendo meio MH caldo inoculado com uma suspensão de células bacterianas a  $1 \times 10^5$  ufc/mL por poço. Cada coluna da placa de 96 poços representa um grupo (controle ou teste) e cada linha representa diluição seriada, iniciando na primeira fileira (mais concentrado) seguindo para última fileira (menos concentrado).

Para os grupos teste, foram organizados e analisados da seguinte forma:

- Para os pós-bióticos de *Lactobacillus* foram testadas as seguintes concentrações:

Linha 1 [50% v/v], Linha 2 [25% v/v], Linha 3 [12,5% v/v], Linha 4 [6,25% v/v], Linha 5 [3,12% v/v], Linha 6 [1,56% v/v], Linha 7 [0,78% v/v] e Linha 8 [0,39% v/v].

- Para NaBut foram testadas as seguintes concentrações:

Linha 1 [50 mM], Linha 2 [25 mM], Linha 3 [12,5 mM], Linha 4 [6,25 mM], Linha 5 [3,125mM], Linha 6 [1,562 mM], Linha 7 [0,781 mM] e Linha 8 [0,390 mM].

## **4.6 Confeção da Placa – Concentração Mínima Inibitória (CIM).**

### **4.6.1 – Preparação dos Pós-bióticos de *L. reuteri* e *L. rhamnosus***

Na elaboração dos pós-bióticos, 1000 µL de *Lactobacillus* spp. foram inoculados em um tubo Falcon (GREINER - 50mL), contendo 20 mL de caldo MRS com culturas puras e recentemente preparadas. O sistema foi submetido à incubação em estufa por um período de 48 horas. Após esse intervalo, na ocorrência bem-sucedida do crescimento bacteriano, as amostras foram submetidas a centrifugação a 2000 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos, utilizando a centrífuga TDL80-2B (Arcano®). Posteriormente, o sobrenadante resultante foi filtrado por meio de um filtro de membrana estéril com poros de 0,22 µm (KASVI) e transferido para outro tubo Falcon estéril (GREINER - 50 mL). Após o processo de filtração, os pós-bióticos foram armazenados a - 5°C por um período máximo de 3 dias, aguardando sua utilização subsequente nas análises de Concentração Inibitória Mínima (CIM).

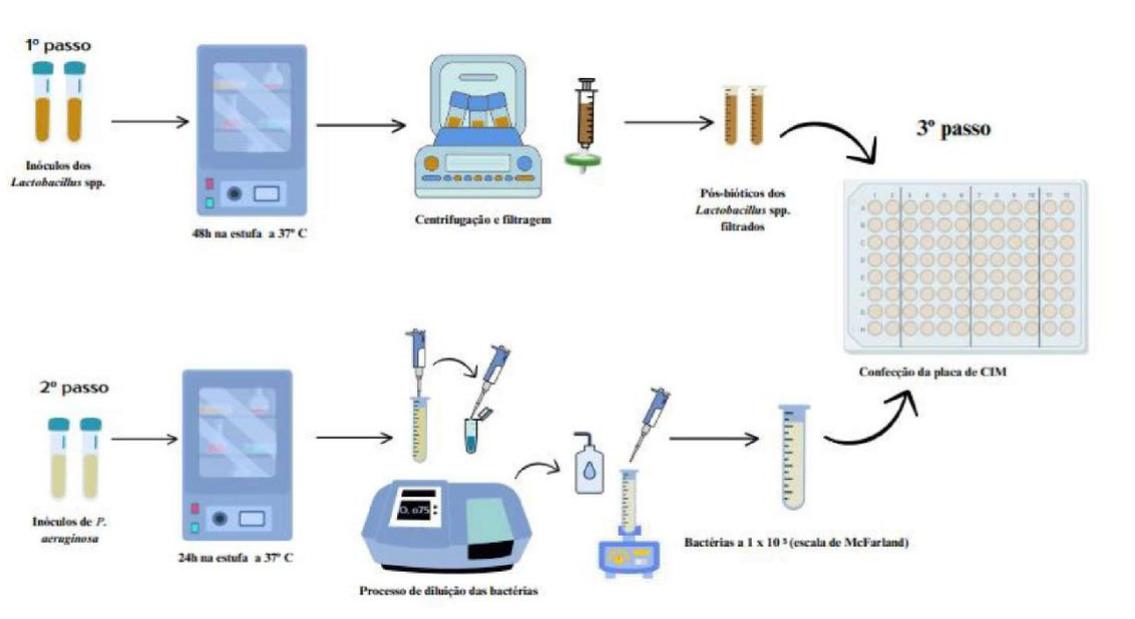
### **4.6.2 – Semeio de *Pseudomonas aeruginosa*.**

As bactérias foram semeadas em MH caldo. Foram semeadas de 400 a 500µl de bactéria em 10 mL de meio MH, em tubo falcon (GREINER-15 mL). Após o semeio, os inóculos foram incubados em estufa a 37°C por 24h.

### **4.6.3 – Ajuste de *Pseudomonas aeruginosa* na escala de MacFarland.**

As espécies bacterianas foram ajustadas utilizando a metodologia de espectrofotometria com o Espectrofotômetro BTS 310 (BioSystems® 23, Barcelona, Espanha). O equipamento foi calibrado para o comprimento de onda igual a 600 nm para leitura da Densidade Óptica (OD), configurado para leitura monocromática. As amostras foram acionadas para leitura e diluídas a partir do primeiro valor de absorvância em água destilada, até que se chegasse a uma absorvância entre 0,075 e 0,085, equivalente a 10<sup>6</sup> micro-organismos/mL. Após

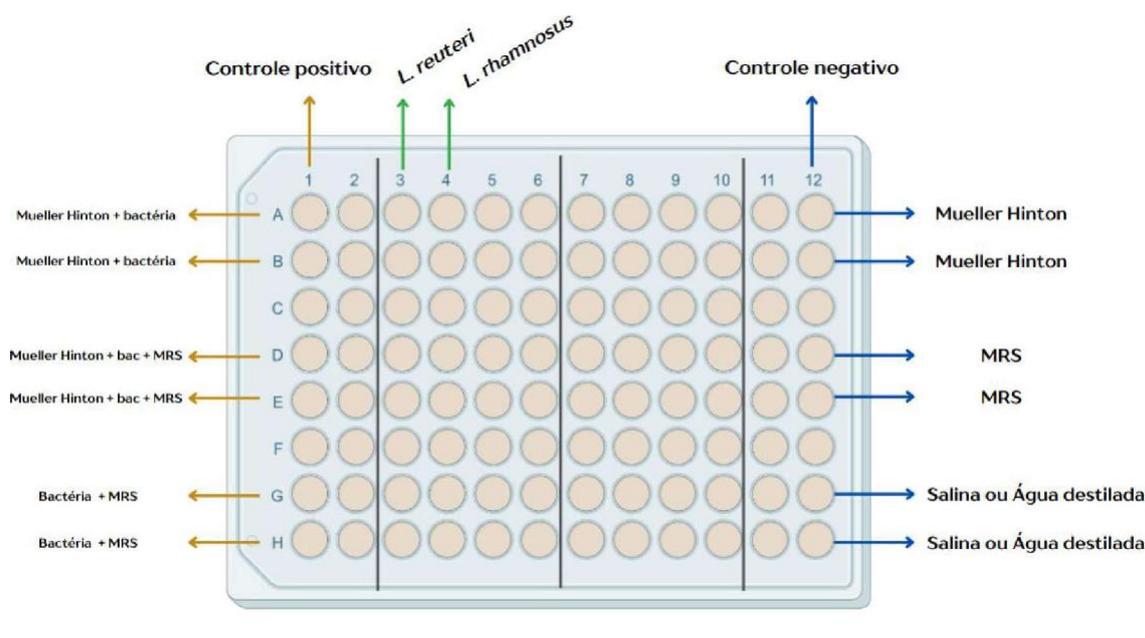
o ajuste de OD, foi realizada outra diluição 1:10 (1mL da diluição bacteriana e 9mL de água destilada) para a obtenção numérica de  $10^5$  micro-organismos/mL.



**Figura 3:** Esquema prático da metodologia empregada nos ensaios de Concentração Mínima Inibitória. **Fonte:** ARAÚJO, 2024.

#### 4.6.4 – Planejamento e execução das placas dos pós-bióticos de *Lactobacillus* spp.

Em cada experimento foram confeccionadas: uma para *L. reuteri* e outra placa para *L. rhamnosus*. A placa de 96 poços possui 12 colunas, sendo cada coluna um grupo de *Lactobacillus* sp., controle de crescimento e controle negativo, e cada linha representando um valor da diluição seriada, como ilustrado na **figura 4** a seguir.



**Figura 4:** Esquema da placa de 96 poços representando o planejamento do experimento com pós-bióticos. Fonte: TORQUATI MADEIRA COSTA, 2024.

Todos os experimentos seguiram os seguintes volumes e concentrações:

Coluna 1: Controle positivo de crescimento (os meios estavam na concentração padrão de 1x):

- Coluna 1, linhas A e B: bactéria + MH (150  $\mu$ L de MH + 10  $\mu$ L *P. aeruginosa*);
- Coluna 1, linha D e E: bactéria + MH + MRS (150  $\mu$ L de MH + 150  $\mu$ L MRS + 10  $\mu$ L de *P. aeruginosa*);
- Coluna 1, linha G e H: bactéria + MRS (150  $\mu$ L MRS + 10  $\mu$ L de *P. aeruginosa*);

Coluna 3: Pós-bióticos de *L. reuteri*:

- Coluna 3, linha A: 150  $\mu$ L de MH + 150  $\mu$ L de pós-bióticos de *L. reuteri* (diluição seriada), foram retirados 150  $\mu$ L e transferidos para o poço/linha seguinte;
- Coluna 3, linhas B, C, D, E, F, G: 150  $\mu$ L de MH + 150  $\mu$ L de pós-bióticos retirados do poço anterior;

- Coluna 3, linha H: 150 µL de MH + 150 µL de pós-bióticos retirado do poço anterior, homogeneizado e retirado 150 µL e descartado para concluir a diluição;
- Ao final das diluições foi acrescentado 10 µL de *P. aeruginosa*;
- O volume final de cada poço foi de 160 µL.

Coluna 4: Pós-bióticos de *L. rhamnosus*:

- Coluna 4, linha A: 150 µL de MH + 150 µL de pós-bióticos de *L. rhamnosus* (diluição seriada), foi retirado 150 µL e transferido para o poço/linha seguinte.
- Coluna 4, linhas B, C, D, E, F, G: 150 µL de MH + 150 µL de pós-bióticos retirados do poço anterior.
- Coluna 4, linha H: 150 µL de MH + 150 µL de pós-bióticos retirado do poço anterior, homogeneizado e retirado 150 µL e descartado para concluir a diluição.
- Ao final das diluições, é acrescentado 10 µL de *P. aeruginosa* em todos os poços.
- O volume final de cada poço foi 160 µL.

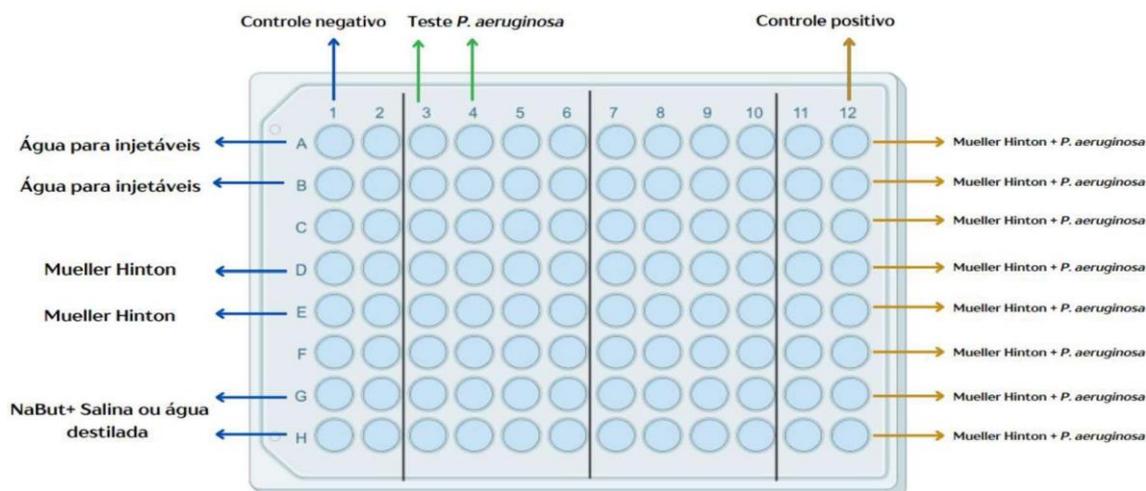
Coluna 12: Controle negativo (150 µL de cada poço):

- Linhas A e B: MH
- Linhas D e E: MRS
- Linhas G e H: Salina ou água destilada

*4.6.5 — Planejamento e execução das placas de NaBut.*

As bactérias foram semeadas em MH caldo. Foram semeadas de 400 a 500 µL do pré-inóculo de bactéria em 10 mL de meio MH, em tubo falcon (GREINER-15 mL). Após o semeio, os inóculos foram adicionados à estufa por 24h. Após, foram ajustadas a escala de McFarland, até que se alcançasse a absorvância entre 0,075 e 0,085, equivalente a  $10^5$  micro-organismos/mL ou

aproximadamente  $10^5$  Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por mililitro. Como detalhado na **figura 5** a seguir.



**Figura 5:** Esquema da placa de 96 poços representando o planejamento do experimento com NaBut. **Fonte:** Elaboração própria.

Em cada experimento foi confeccionada uma placa para *P. aeruginosa*. No primeiro poço da coluna 3 foi adicionado 160  $\mu\text{L}$  de água para injetáveis (ISOFARMA®), e nos demais poços (B - H) pipetava-se 100  $\mu\text{L}$  de água para injetáveis, em seguida pipetava-se no primeiro poço 40  $\mu\text{L}$  de NaBut e depois fazia-se a diluição seriada, retirando do primeiro poço (linha A) 100  $\mu\text{L}$  e passando para o segundo (linha B) até o último poço (linha H) seguindo diluição seriada e descartando 100  $\mu\text{L}$  do último poço para concluir a diluição. Após a diluição foi acrescentado em todos os poços 100  $\mu\text{L}$  do master-mix (meio de cultivo MH + *P. aeruginosa*), e incubadas na estufa a 37°C por 24h.

Coluna 1: Controle negativo (150  $\mu\text{L}$  de cada poço):

- Linhas A e B: água para injetáveis;
- Linhas D e E: MH;
- Linhas G e H: NaBut (40  $\mu\text{L}$ ) + Salina ou água destilada (110  $\mu\text{L}$ );

Colunas 3 e 4: Realização da CIM com NaBut:

- Diluição seriada: Linha A [50 mM], Linha B [25 mM], Linha C [12,5 mM], Linha D [6,25 mM], Linha E [3,125mM], Linha F [1,562 mM], Linha G [0,781 mM] e Linha H [0,390 mM].

#### Coluna 12: Controle de crescimento (MH + *P. aeruginosa*)

- Linhas A a H: MH + *P. aeruginosa*

### 4.7 — Leitura das placas por espectrofotometria

Após o período de 24h de incubação, todas as placas foram lidas em leitora de microplaca (PerkinElmer EnSpire multimode plate reader ®) com método de espectrofotometria, no comprimento de onda de 600 nm, em protocolo pré-estabelecido para leitura total da placa as leituras permitiram calcular a absorvância da amostra por densidade óptica.

### 4.8 — Gráficos e Estatística

Os dados foram analisados com auxílio do programa GraphPad *Prism* (versão 8 para Windows). Os resultados da OD (Densidade Óptica) das curvas de crescimento foram inseridos no programa, para confecção dos gráficos. Os valores de densidade óptica (600 nm) no eixo Y e valores de concentrações (dose-resposta) apresentados em ordem numérica no eixo X. As amostras foram testadas para normalidade da distribuição dos dados e as análises estatísticas, quando pertinentes, foram realizadas empregando um teste para múltiplas comparações, com repetições biológicas do mesmo experimento para comprovação dos resultados.

Os gráficos foram configurados separadamente, quando representando a análise individual de cada grupo: CIM1, CIM2 e CIM3, sendo cada CIM uma réplica biológica, para os testes com *Lactobacillus*, e para os testes com NaBut grupos CIM1 e CIM2 (duplicata biológica).

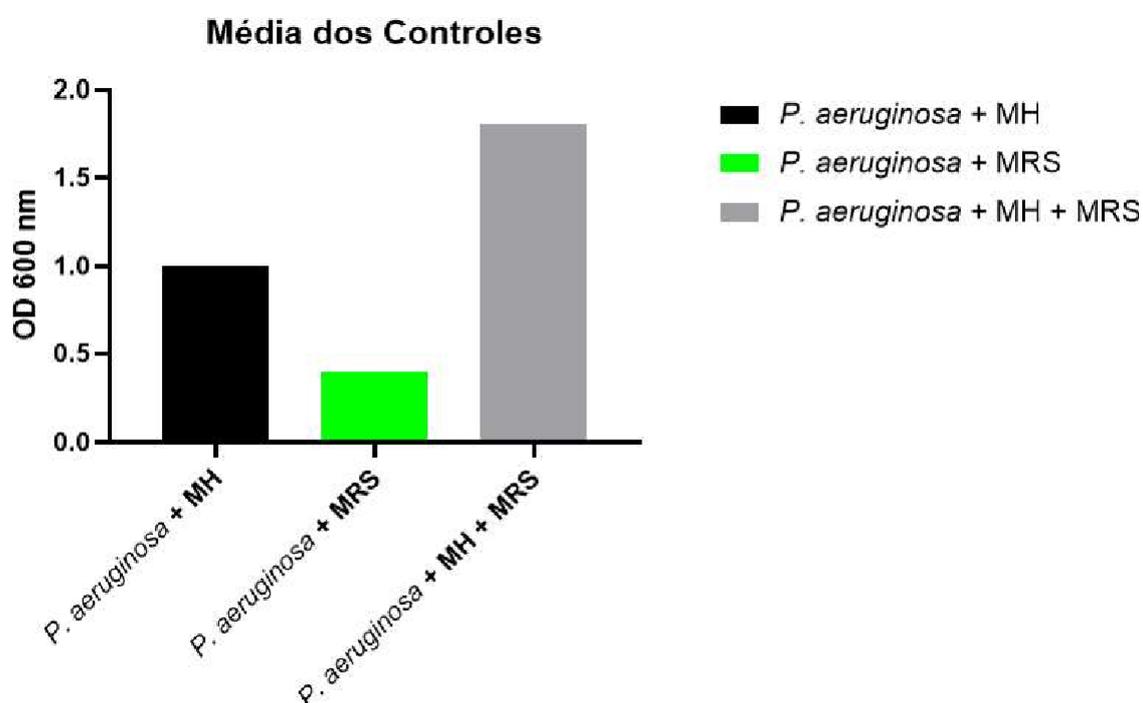
Os gráficos de desvio padrão foram gerados a partir da análise conjunta das réplicas biológicas, utilizando a média das OD de cada poço, ou seja, cada concentração da diluição seriada gerou três valores de OD. O programa

estatístico do *GraphPad* analisa automaticamente a média entre os valores de cada poço e gera o desvio padrão da amostra.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 — Análise do efeito dos meios sobre o crescimento de *P. aeruginosa*

Inicialmente, foi avaliada curvas de crescimentos de *P. aeruginosa* no meio MH (próprio para crescimento *P. aeruginosa*), no meio MRS (próprio para crescimento de *Lactobacillus* spp.) e no meio MH acrescido de 50% do meio MRS para *Lactobacillus* (Figura 6).



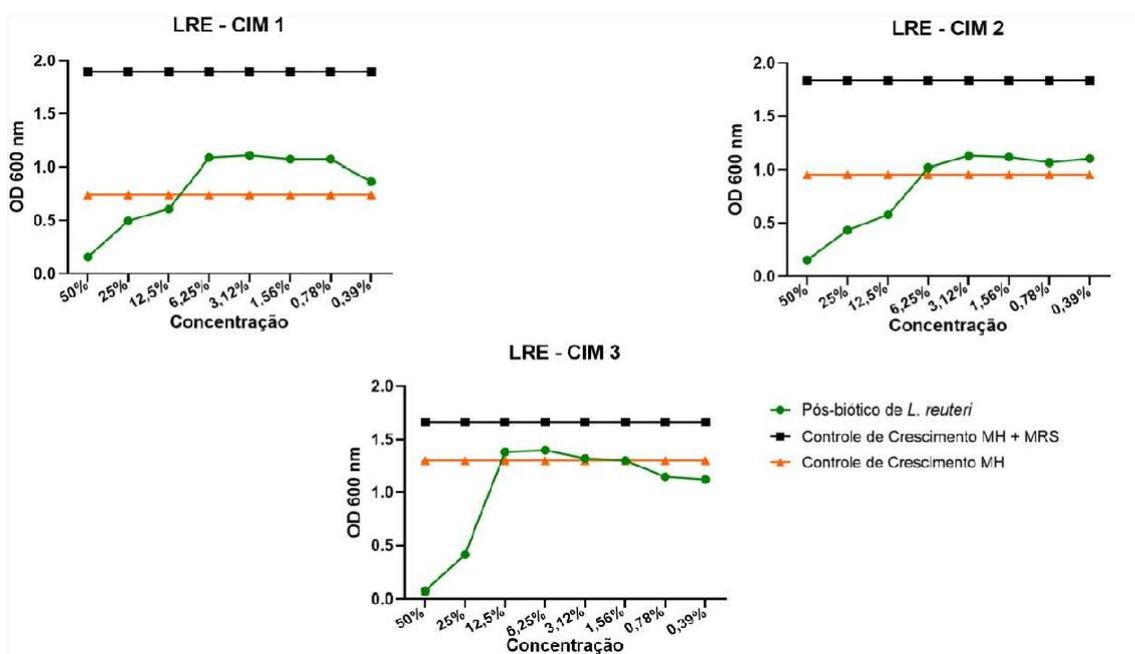
**Figura 6: Análise do viés dos meios sobre o crescimento de *P. aeruginosa*. Meios de cultivo Mueller Hinton e MRS combinados e separadamente.**

Conforme se observa no gráfico da figura 6, a combinação de MH e MRS permitiu um crescimento melhor de *P. aeruginosa* (barra **cinza**), em relação ao crescimento em MH somente (barra **preta**). Portanto, para todos os testes de CIM que sucederam, foi considerado o meio MH + MRS (volume de 50% de pós-bióticos + 50% de MH) como **controle positivo de crescimento**. Embora também foi usado como controle de crescimento secundário a condição de *P. aeruginosa* no meio MH. O racional para escolha deste modelo de controle se deu para evitar vieses de algum efeito inibitório do meio MRS sobre o crescimento de *P. aeruginosa*, o que poderia interferir na análise real dos pós-

bióticos, visto que, para essas análises, é necessário adicionar o sobrenadante de culturas dos *Lactobacillus* previamente cultivados no MRS, filtrado e livre de células.

## 5.2 — Testes CIM para *P. aeruginosa*: pós-bióticos de *L. reuteri*.

Os testes realizados com os pós-bióticos produzidos por *Lactobacillus reuteri* obtiveram resultados observados na **figura 7** a seguir. Mesmo na concentração mais baixa avaliada, de 0,39% v/v, ocorreu diminuição sobre o crescimento de *P. aeruginosa* comparada com à média ponderada do controle de crescimento. O controle de crescimento é constituído por 150  $\mu$ L do meio MUELLER HINTON + 150  $\mu$ L do meio LACTOBACILLI MRS BROTH + 10  $\mu$ L da suspensão na escala MacFarland para *P. aeruginosa*.

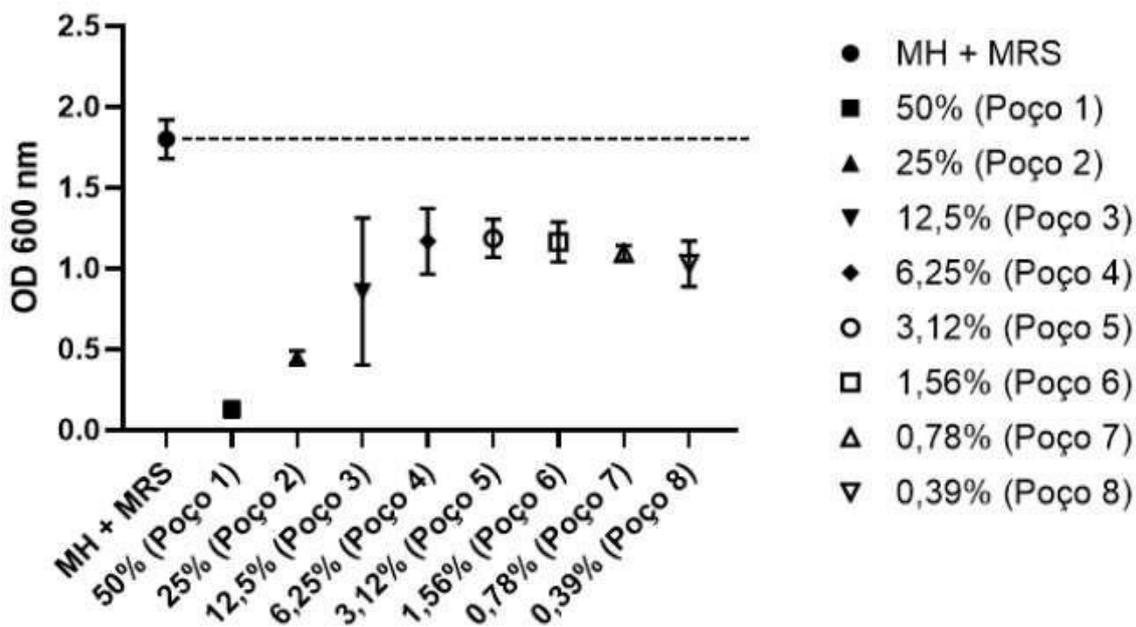


**Figura 7: Efeito dos pós-bióticos de *L. reuteri* sobre o crescimento de *P. aeruginosa*.** As análises foram realizadas no intervalo de crescimento de 24 horas. O eixo Y indica a densidade óptica (600 nm), o eixo X indica a concentrações seriadas dos compostos analisados. A numeração (1-8) no eixo X indica o sentido de concentração dos compostos testados, esses valores representam diluição seriada dos compostos analisados (da maior a menor concentração sendo: 1 = [50%]; 2 = [25%]; 3 = [12.5%]; 4 = [6.25%]; 5 = [3.12%]; 6 = [1.56%]; 7 = [0.78%]; 8 = [0.39%]). A linha **preta** representa o controle de crescimento com o meio MH com a presença de MRS e *P. aeruginosa*. A linha **laranja** representa o controle de crescimento secundário, MH e *P. aeruginosa*. A linha **verde** representa o grupo teste: pós-bióticos de *L. reuteri* seguindo diluição seriada e *P. aeruginosa*. Cada gráfico representa uma réplica biológica do estudo.

Em todas as réplicas biológicas é possível observar que há um crescimento acima do controle secundário, a partir do ponto 3 ou 4 (12,5%; 6,75% v/v respectivamente). Contudo, em todas as réplicas o crescimento é inferior ao controle positivo (linha **preta**).

A análise estatística a partir das médias das réplicas biológicas, por porcentagem de crescimento em relação ao controle primário, para cada concentração avaliada, aponta redução no crescimento de *P. aeruginosa* de **92,89%** na concentração de 50% v/v (poço 1), na concentração de 25% v/v (poço 2) houve redução de **75,07%** no crescimento, concentração de 12,5% v/v (poço 3) houve redução de **52,32%**, na concentração de 6,25% v/v (poço 4) houve redução de 35,05%, na concentração de 3,12% v/v (poço 5) houve redução de 34,06%, na concentração de 1,56% v/v (poço 6) houve redução de 35,34%, na concentração de 0,78% v/v (poço 7) houve redução de 39,14% e concentração de 0,39% redução de 42,82%.

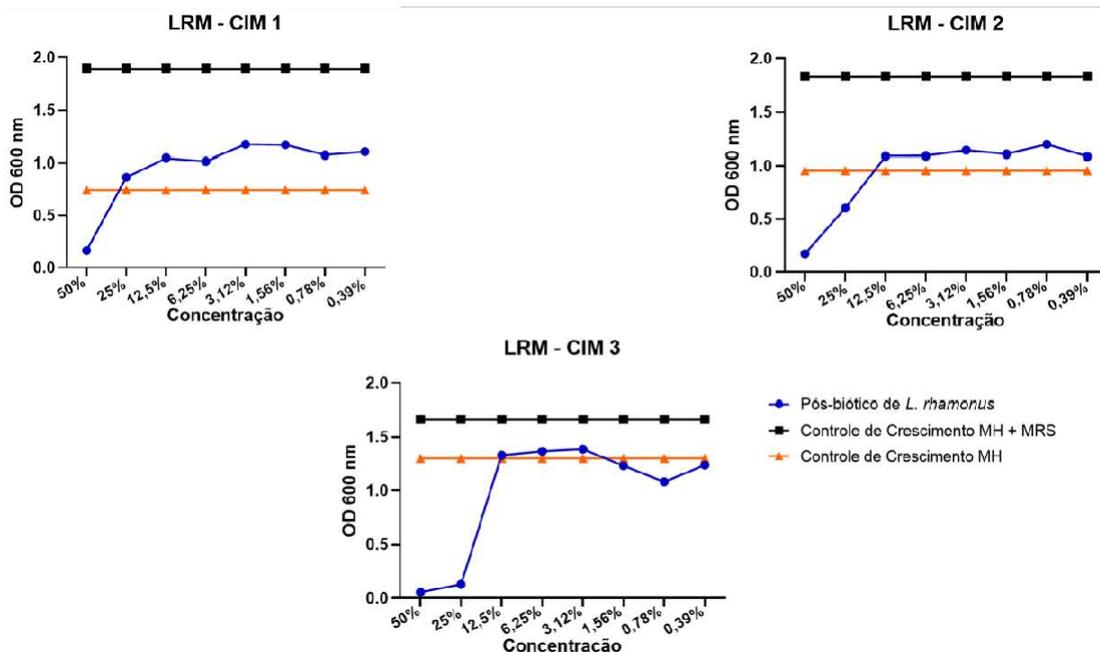
A **figura 8** a seguir representa a análise global das médias de cada concentração e seus respectivos desvio padrão. É possível observar na análise conjunta dos dados os coeficientes de variação entre os experimentos, demonstrando haver uma variação próxima entre as concentrações de 50 e 25% v/v. Essas concentrações dos pós-bióticos de *L. reuteri* apresentaram constância em seus resultados de redução sobre crescimento da bactéria alvo. O desvio padrão do controle demonstrou que houve variação no crescimento de *P. aeruginosa* somente na presença dos meios de cultura. Os gráficos com desvio padrão foram confeccionados para permitir analisar a distribuição dos dados, visando propor uma observação unificada, e livre de vieses, do fenômeno observado.



**Figura 8:** Desvio padrão representando o grau de variação, entre as réplicas biológicas, do efeito dose-dependente do pós-bióticos de *L. reuteri* sobre o crescimento de *P. aeruginosa*. O eixo Y indica a densidade óptica (600 nm), o eixo X indica a concentrações seriadas dos compostos analisados O eixo X indica o sentido de concentração dos compostos testados, esses valores representam diluição seriada dos compostos analisados da maior a menor concentração. A linha pontilhada representa a média global do controle positivo, com desvio em seu ponto inicial. As barras representam desvio padrão entre as réplicas biológicas.

### 5.3 Testes CIM para *P. aeruginosa* — Pós-bióticos de *L. rhamnosus*.

Os testes realizados com os pós-bióticos produzidos por *Lactobacillus rhamnosus* obtiveram resultados observados na **figura 9** a seguir. Mesmo na concentração mais baixa avaliada, de 0,39% v/v, referente ao oitavo ponto, ocorreu diminuição do crescimento de *P. aeruginosa* comparada com à média ponderada do controle de crescimento (linha **preta**). O controle de crescimento é constituído por 150 µL do meio MUELLER HINTON + 150 µL do meio LACTOBACILLI MRS BROTH + 10 µL da suspensão na escala MacFarland para *P. aeruginosa*.



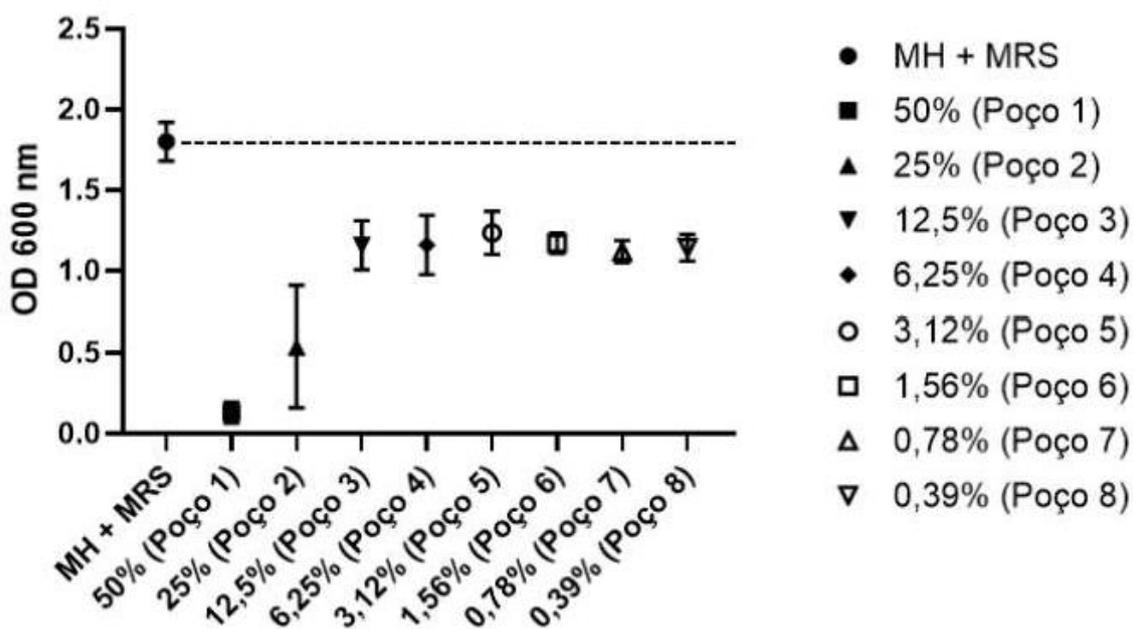
**Figura 9: Efeito dos pós-bióticos de *L. rhamnosus* sobre o crescimento de *P. aeruginosa*.** As análises foram realizadas no intervalo de crescimento de 24 horas. O eixo Y indica a densidade óptica (600 nm), o eixo X indica a concentrações seriadas dos compostos analisados. A numeração (1-8) no eixo X indica o sentido de concentração dos compostos testados, esses valores representam diluição seriada dos compostos analisados (da maior a menor concentração sendo: 1 = [50%]; 2 = [25%]; 3 = [12.5%]; 4 = [6.25%]; 5 = [3.12%]; 6 = [1.56%]; 7 = [0.78%]; 8 = [0.39%]). A linha **preta** representa o controle de crescimento com o meio MH com a presença do MRS e *P. aeruginosa*. A linha **laranja** representa o controle de crescimento MH e *P. aeruginosa*. A linha **azul** representa o teste: pós-bióticos de *L. rhamnosus* seguindo diluição seriada e *P. aeruginosa*. Cada gráfico representa uma réplica biológica do estudo.

Na réplica biológicas CIM1 é possível observar que há um crescimento acima do controle secundário, a partir do ponto 2 (25% v/v), enquanto nas réplicas CIM2 e CIM3 este mesmo fenômeno só foi observado a partir do ponto 3 (12,5% v/v). Contudo, em todos os ensaios o crescimento é inferior ao controle positivo (linha **preta**).

A análise estatística a partir das médias das réplicas biológicas, por porcentagem de crescimento em relação ao controle primário, para cada concentração avaliada, aponta redução no crescimento de *P. aeruginosa* na ordem de **92,73%** na concentração de 50% v/v (poço 1), na concentração de 25% v/v (poço 2) houve redução de **70,34%** no crescimento, concentração de 12,5% v/v (poço 3) redução de 35,74%, concentração de 6,25% v/v (poço 4) redução de 35,6%, concentração de 3,12% v/v (poço 5) redução de 31,41%, concentração de 1,56% v/v (poço 6) redução de 34,99%, concentração de 0,78%

v/v (poço 7) redução de 37,92% e concentração de 0,39% v/v (poço 8) houve redução de 36,50%.

Na análise conjunta dos dados na **figura 10**, com os respectivos desvios padrão (DP) da amostra, é possível observar os coeficientes de variação entre os experimentos. Há uma variação próxima entre as concentrações de 50, 12,5% a 0,39%. Contudo, no ponto 2 (25% v/v) houve um DP maior entre as réplicas biológicas. O efeito dos pós-bióticos de *L. rhamnosus* apresentaram constância em seus resultados e houve maior redução no crescimento de *P. aeruginosa* nas concentrações de 50 e 25%. Os gráficos com desvio padrão foram confeccionados para permitir analisar a distribuição dos dados, visando propor uma observação unificada, e livre de vieses, do fenômeno observado.

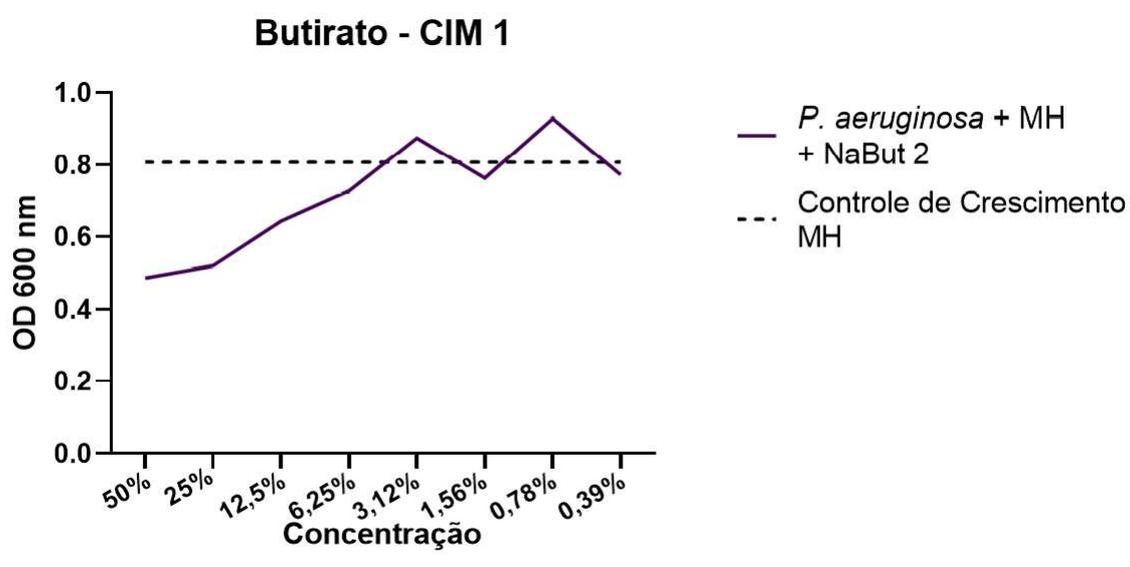


**Figura 10:** Desvio padrão representando o grau de variação, entre as réplicas biológicas, do efeito dose-dependente do pós-biótico de *L. rhamnosus* sobre o crescimento de *P. aeruginosa*. O eixo Y indica a densidade óptica (600 nm), o eixo X indica as concentrações seriadas do pós-biótico analisado, valores representam diluição seriada dos compostos analisados da maior a menor concentração. A linha pontilhada representa a média global do controle positivo de crescimento, com desvio em seu ponto inicial. As barras representam desvio padrão entre as réplicas biológicas.

A **Figura 10** sinaliza os coeficientes de variação entre os experimentos, demonstrando haver uma variação próxima entre as concentrações de 12,5%

(poço 3) ao de 0,39% (poço 8), já as concentrações de 50% (poço 1) e 25% (poço 2) ficaram bem próximas. As concentrações dos pós-bióticos de *L. rhamnosus* tiveram melhor redução nas concentrações de 50% e 25%. Os gráficos com desvio padrão foram confeccionados para permitir analisar a distribuição dos dados, visando propor uma observação unificada e mais robusta do fenômeno observado.

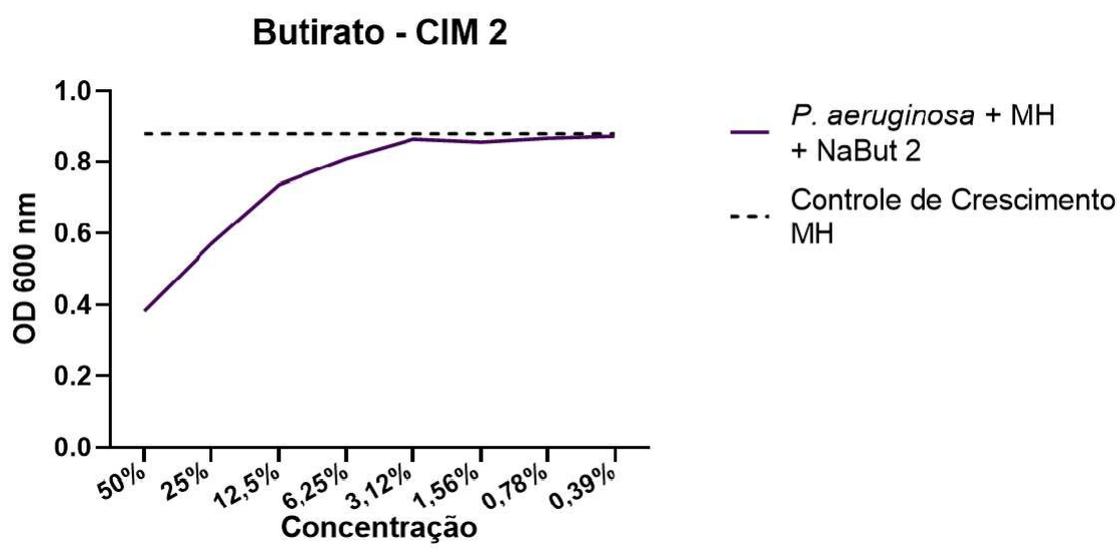
#### 5.4 Testes CIM para *P. aeruginosa* — NaBut.



**Figura 11: Efeito do NaBut sobre o crescimento de *P. aeruginosa*, 1ª placa.** A análise foi realizada no intervalo de crescimento de 24 horas, seguindo o mesmo protocolo de diluição dos *Lactobacillus* spp. O eixo Y representa a densidade óptica (OD 600 nm), o eixo X (1-8) representa as diluições seriadas do NaBut, do mais concentrado para o menos concentrado. A linha preta pontilhada representa o controle de crescimento, poço que contém apenas *P. aeruginosa* e MH. A linha violeta representa o grupo tratado com concentrações seriadas do NaBut na presença do MH: Linha 1 [50 mM], Linha 2 [25 mM], Linha 3 [12,5 mM], Linha 4 [6,25 mM], Linha 5 [3,12 mM], 6 = [1.56 mM], 7 = [0.78 mM], 8 = [0.39 mM]. O gráfico representa uma réplica biológica com duplicata técnica entre poços.

Os dados apresentados na **Figura 11** indicam que, até o quarto poço, correspondente a uma concentração de 6,25 mM, houve redução no crescimento de *P. aeruginosa*. A análise estatística a partir das médias das réplicas técnicas, por porcentagem de crescimento em relação ao controle, para cada concentração avaliada, aponta redução no crescimento de *P. aeruginosa* de **39,73%** na concentração de 50 mM (poço 1), na concentração de 25 mM (poço

2) houve redução de **38,12%** no crescimento, na concentração de 12,5 mM (poço 3)  
 3) houve redução de **20,30%**, na concentração de 6,25 mM (poço 4) houve redução de **9,9%**. Portanto, pode-se inferir essa como a menor concentração para inibição. Tal comparação dos testes são feitas em referência à média do controle de crescimento, o qual foi estabelecido utilizando o meio Muller Hinton combinado com *P. aeruginosa*, conforme a escala de McFarland.



**Figura 12: Efeito do NaBut placa 2 sobre o crescimento de *P. aeruginosa*, 2ª placa.** A análise foi realizada no intervalo de crescimento de 24 horas, seguindo o mesmo protocolo de diluição dos *Lactobacillus* spp. O eixo Y representa a densidade óptica (OD 600 nm), o eixo X (1-8) representa as diluições seriadas do NaBut, do mais concentrado para o menos concentrado. A linha preta pontilhada representa o controle de crescimento, poço que contém apenas *P.aeruginosa* e MH. A linha violeta representa o grupo tratado com concentrações seriadas do NaBut na presença do MH: Linha 1 [50 mM], Linha 2 [25 mM], Linha 3 [12,5 mM], Linha 4 [6,25 mM], Linha 5 [3,12 mM], 6 = [1.56 mM], 7 = [0.78 mM], 8 = [0.39 mM]. O gráfico representa uma réplica biológica com duplicata técnica entre poços.

Os dados apresentados na **Figura 12** indicam que, até o quarto poço, correspondente a uma concentração de 6,25mM, houve uma redução significativa de *P. aeruginosa*. A análise estatística a partir das médias das réplicas técnicas, por porcentagem de crescimento em relação ao controle, para cada concentração avaliada, aponta redução no crescimento de *P. aeruginosa* de **56,43%** na concentração de 50 mM (poço 1), na concentração de 25 mM (poço 2) houve redução de **35,04%** no crescimento, concentração de 12,5 mM

(poço 3) houve redução de **16,27%**, na concentração de 6,25 mM (poço 4) houve redução de **7,96%**. Portanto, pode-se inferir essa como a menor concentração para inibição. Tal comparação dos testes são feitas em referência à média do controle de crescimento, o qual foi estabelecido utilizando o meio Muller Hinton combinado com *P. aeruginosa*, conforme a escala de McFarland.

## 6. DISCUSSÃO

O papel dos pró-bióticos e, mais recentemente, dos seus metabólitos —os pós-bióticos— vem sendo explorado em estudos *in vitro*, que primam por elucidar os possíveis mecanismos relacionados aos efeitos evidenciados sobre a resposta imunológica, até abordagens promissoras para tratamento de cânceres.

### 6.1 *Lactobacillus* sp. & Pós-bióticos

Há na literatura científica uma variedade de estudos investigando, particularmente *in vitro*, os pró-bióticos e seus efeitos sobre saúde humana e animal. Estudos em seres humanos demonstraram que espécies de *Lactobacillus* possuem efeitos antialérgicos em pacientes com rinite alérgica, reduzindo sintomas nasais e oculares. Esse potencial se deve à sua capacidade imunomoduladora, que aumenta a produção de citocinas Th1 e reduzindo citocinas Th2 e reduzindo imunoglobulinas relacionadas a alergia (STEINER; LORENTZ, 2021).

Os *Lactobacillus* também possuem efeito sobre a prevenção do envelhecimento humano, pelo seu potencial antioxidante induzido sobre D-galactose. O monossacarídeo D-galactose está ligado diretamente no processo de envelhecimento por reduzir a atividade enzimática da cadeia respiratória, como na síntese de ATP, disfunção mitocondrial e aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (KUMAR et al., 2022).

Na microbiota vaginal saudável são encontradas espécies como *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners* e *L. jensenii* (CHEE; CHEW; THAN, 2020). Esses tipos de microrganismos estão associados na prevenção de invasão de microrganismos patogênicos. As espécies como *Lactobacillus gasseli* e *Lactobacillus crispatus* administradas por via oral possuem efeito na restauração da microbiota vaginal (QI et al., 2023).

Por outro lado, em fase inicial, se encontram os estudos empregando/investigando os pós-bióticos. Esses metabólitos produzidos ou

procedentes dos pró-bióticos vem surgindo como uma “espada” e/ou um “escudo” na manutenção e defesa da homeostasia.

Dados demonstram que pós-bióticos conseguiram eliminar células tumorais ao modular respostas imunológicas e ativarem citocinas anti-inflamatórias e pró-apoptóticas, como TRAIL, interleucina (IL)-10 e TGF- $\beta$  (KIM; KIM; CHO, 2021).

Embora haja evidências dos efeitos benéficos dos pós-bióticos na saúde humana, e tais evidências nortearam a hipótese testada neste estudo, cabe destacar que uso desses compostos para controle do crescimento que impeçam colonização por patógenos, é ainda escasso. Os poucos estudos que citam efeitos antimicrobianos não determinaram concentrações ideais de uso, e nem investigaram, por métodos microbiológicos clínicos, a CIM dos pós-bióticos.

Neste contexto, o presente estudo teve o interesse de avaliar o efeito do sobrenadante de cultura (pós-bióticos) das espécies de *L. reuteri* e *L. rhamnosus* e do butirato de sódio sobre o crescimento de *P. aeruginosa*, além de determinar as concentrações inibitórias mínimas. A escolha das espécies dos lactobacilos se deu pelas evidências robustas dos benefícios que esses pró-bióticos apresentam na literatura.

*L. reuteri* é uma espécie pró-biótica que coloniza diversas partes do corpo humano, como a microbiota intestinal, pele, trato urinário e leite materno. Esta bactéria produz etanol, reuterina e ácidos orgânicos com atividade antimicrobiana, ajudando a eliminar microrganismos patogênicos e melhorando a resposta imunológica. *L. reuteri* também consegue reduzir citocinas pró-inflamatórias, o que pode diminuir a inflamação e prevenir a progressão de doenças inflamatórias crônicas (MU; TAVELLA; LUO, 2018).

*L. rhamnosus* é também uma espécie pró-biótica com propriedades antimicrobianas relatadas. Hamad relatou a capacidade antibacteriana de suspensões de culturas produzidas a partir de quatro cepas probióticas, incluindo *L. rhamnosus*, *L. fermentum*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* e *Pediococcus acidilactici*, contra *Clostridium perfringens* (HAMAD et al., 2020).

## 6.2 Análise do efeito dos pós-bióticos sobre crescimento *in vitro* de *P. aeruginosa*

Inicialmente, para investigar algum possível efeito dos pós-bióticos sobre o crescimento de *P. aeruginosa*, foi necessário validar as adaptações do protocolo do BrCAST empregado.

A primeira adaptação foi o uso de concentrações variadas, a partir de 50% volume por volume, de pós-bióticos presentes no meio de crescimento dos *Lactobacillus* sp., o MRS, acrescidas ao meio de cultivo de *P. aeruginosa* (MH). Os pós-bióticos são liberados no sobrenadante do meio de cultivo (MRS), e este meio poderia ser o interferente mais importante na análise dos dados. Destarte, foi necessário eliminar o viés de que o MRS teria efeito inibidor sobre crescimento de *P. aeruginosa*.

Os dados da **figura 6** claramente apontam um efeito estimulante do MRS sobre *P. aeruginosa*, haja vista que as bactérias cresceram mais na condição de 50% de MSR acrescido ao meio MH. Este dado foi inesperado, pois MRS é um meio de cultivo específico para *Lactobacillus* spp., seletivo para microrganismos fastidiosos (COX; BRIGGS, 1954). O crescimento melhorado na mistura dos meios foi excelente para esta pesquisa, haja vista que qualquer efeito que reduza o crescimento na presença do pós-biótico poderia ser atribuído exclusivamente à existência de moléculas presentes no filtrado do sobrenadante.

O uso de sobrenadante de cultura filtrada para obtenção de pós-bióticos já havia sido testado em um estudo. Os dados apontam uma inibição significativa pelo ácido láctico, a partir do filtrado de culturas das espécies de *Lactobacillus*, sobre o crescimento de bactérias como: *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, e de fungos como: *Aspergillus niger* e *Aspergillus flavus* (GEORGE-OKAFOR; NWACHUKWU; MIKE-ANOSIKE, 2018).

Assim, havia evidências sugerindo um papel importante dos pós-bióticos como, por exemplo, o ácido láctico e outros, presentes no sobrenadante de culturas puras de *Lactobacillus* sp. Todavia, o uso do sobrenadante total livre de células e a determinação de uma concentração inibitória mínima ainda carece investigação.

### 6.3 Atividade antimicrobiana dos pós-bióticos de *Lactobacillus* spp.

Nos testes realizados com os pós-bióticos de *Lactobacillus reuteri* e *Lactobacillus rhamnosus*, observou-se resultados em todas as concentrações testadas até o volume de 0,39%, quando comparados ao controle de crescimento com os meios MRS mais o Muller Hinton. No entanto, em comparação ao controle utilizando apenas o meio Muller Hinton (controle secundário), houve uma redução no crescimento de *P. aeruginosa* até a concentração de 25% v/v.

Corroborando os dados desta pesquisa, no estudo realizado por Wieërs et al. (2021), foi observada uma redução do crescimento de espécies bacterianas, incluindo *P. aeruginosa*. Além disso, o estudo de RAY MOHAPATRA et al., (2019) relatou que bacteriocinas produzidas por espécies de *Lactobacillus* e purificadas pelos métodos de adsorção-dessorção celular, cromatografia de permeação em gel e cromatografia de interação hidrofóbica, levaram à diminuição do biofilme de *P. aeruginosa*, utilizando métodos baseados em colorimetria.

Estudos que empregaram sobrenadantes isentos de células de *L. rhamnosus* e *L. plantarum* evidenciaram a capacidade de inibição do crescimento de *P. aeruginosa*. Adicionalmente, observou-se que essas duas espécies de *Lactobacillus* prejudicaram a formação de biofilmes, um aspecto de significativa relevância na colonização por *P. aeruginosa*. A pesquisa também abordou a avaliação de outra bactéria patogênica, *Listeria monocytogenes* (REZAEI; SAEID KHANZADI, 2021).

Outros estudos também demonstram que determinadas cepas de *Lactobacillus* sp. apresentaram atividade antimicrobiana, como as cepas pró-bióticas de *L. acidophilus* (ATCC 4356) e *L. rhamnosus* (ATCC 9595), que obtiveram resultados contra bactérias patogênicas. Os estudos observaram o potencial de inibição mediante variadas técnicas como: fluorescência, microscopia eletrônica e métodos *in silico* (CARMO et al., 2016; MODIRI et al., 2020; FERNANDES, 2019).

Outro estudo investigando pós-bióticos gerado por espécies de *Lactobacillus*, demonstrou atividade antimicrobiana de acidocina 4356 contra *P. aeruginosa*. Trata-se de um peptídeo antimicrobiano produzido pela espécie *Lactobacillus acidophilus* que possui a capacidade de inibir fatores de virulência, provocar a morte do microrganismo e degradar biofilmes (MODIRI et al., 2020).

Interessantemente, o efeito de pós-biótico sobre outra bactéria gram-negativa, *K. pneumoniae*, demonstrou que *L. reuteri* e *L. rhamnosus* exibiram atividade antibacteriana contra isolados clínicos dessa espécie. Fedorova et al. (2018) observaram que essas espécies de *Lactobacillus* reduziram em 20% no primeiro dia e 86% no segundo dia, o crescimento de *K. pneumoniae*. O pró-biótico *L. rhamnosus* se destacou devido à indução de hidrolases de peptidoglicano, enzimas que desintegram a parede celular bacteriana.

#### **6.4 Efeito do Butirato de sódio sobre o crescimento de patógenos humanos.**

O butirato é um **ácido graxo de cadeia curta** (AGCC) com benefícios consideráveis para a saúde intestinal e, nos últimos anos, o butirato tem sido comumente utilizado como alternativa aos antimicrobianos na produção animal.

Neste estudo, os resultados obtidos empregando concentrações variadas de Nabut apontam para uma redução no crescimento de *P. aeruginosa*, nas concentrações de 50 mM a 12,5 mM. Interessantemente, o estudo de WANG et al., (2023) empregando Nabut, demonstrou que larvas de peixe-zebra, pré-tratadas com 6000 µM antes do desafio letal com LPS de *P. aeruginosa*, registaram um aumento significativo da sobrevivência em 40%

O butirato de sódio (Nabut) possui potencial inibitório contra alguns microrganismos, incluindo aqueles responsáveis por infecções e formação de biofilmes em dispositivos médicos, como próteses e cateteres. Tal observação pode ter relação com a sua capacidade de atuar como inibidor da histona desacetilase (HDAC), provocando alterações na conformação da cromatina e interferindo na viabilidade de células planctônicas (CORDEIRO et al., 2019).

A inulina e os fruto-oligossacarídeos, ambos pré-bióticos, são fermentados para gerar AGCC, principalmente acetato, propionato e butirato, presentes no cólon e nas fezes em uma proporção molar aproximada de 60:20:20. Esses ácidos auxiliam na regeneração do epitélio intestinal (TAKAGI et al., 2016; ŻÓŁKIEWICZ et al., 2020). Além disso, eles reduzem a produção de citocinas pró-inflamatórias, evitando a ativação do fator nuclear kappa B (NF-κB). Em um estudo com camundongos, observou-se uma diminuição na aterogênese com o uso de um modelo in vivo de butirato (KASAHARA et al., 2019).

Quando há um excesso de átomos de carbono disponíveis, as bifidobactérias produzem acetato e lactato. A fim de inibir o crescimento de *Klebsiella oxytoca*, cepas como *L. acidophilus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus paracasei* ATCC 335 e *Lactobacillus brevis* produzem AGCC pela lise da parede celular (HIGASHI et al., 2020). Os AGCC trazem diversos benefícios para a saúde, incluindo a melhoria da função colônica, a redução do pH, além de promoverem a proliferação de células epiteliais e aumentarem o fluxo sanguíneo no cólon (MARKOWIAK-KOPEĆ; ŚLIŻEWSKA, 2020).

No estudo de Brandão et al. (2015), o butirato de sódio (NaBut) demonstrou efeitos inibitórios significativos contra a levedura patogênica *Cryptococcus neoformans*. Esse resultado foi atribuído à capacidade do NaBut de inibir histona desacetilases (HDACs), promovendo modificações epigenéticas que induzem alterações fenotípicas específicas no microrganismo, incluindo alterações na estrutura da cápsula e outros atributos de virulência do fungo.

Além de seu potencial antimicrobiano, o NaBut apresenta propriedades anti-inflamatórias e regenerativas significativas. FACCHIN et al., (2020) evidenciou que a administração oral de NaBut em pacientes com doenças inflamatórias intestinais proporciona alívio sintomático.

### **6.5 Vantagens dos Pós-bióticos sobre Pró-bióticos:**

Os pós-bióticos são estáveis em uma ampla faixa de temperaturas e níveis de pH, facilitando sua adição a refeições e componentes antes do processamento térmico sem afetar sua eficácia. Os produtores podem se beneficiar disso, tanto técnica quanto financeiramente. Eles podem ser

empregados em sistemas de entrega, como produtos farmacêuticos e/ou alimentos funcionais, pois a quantidade adequada de pós-bióticos pode ser gerenciada sob condições de fabricação e armazenamento quando a sobrevivência não é o principal fator determinante (RAD et al., 2020).

Lisados bacterianos contendo proteínas da superfície celular, enzimas, peptídeos, metabólitos, neuropeptídeos e ácidos orgânicos menores, como o ácido láctico, são exemplos de pós-bióticos. A fermentação é a fonte mais comum de pós-bióticos na indústria alimentícia. Os pós-bióticos estão naturalmente presentes em muitos produtos lácteos, como kefir, kombucha, iogurte e vegetais em conserva. Geralmente, os gêneros *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium*, *Saccharomyces*, *Bacillus*, *Streptococcus* ou *Faecalibacterium* são microrganismos altamente eficazes na produção de pós-bióticos, na forma de extratos citoplasmáticos e componentes da parede celular (SOKOL et al., 2008; JENSEN et al., 2010; TEJADA-SIMON et al., 1999; ARSHAD et al., 2018).

Dado ao conjunto de argumentos supracitados, somado ao custo econômico da produção de pós-bióticos a partir de alimentos e outras fontes, ALÉM da possibilidade de formulações farmacêuticas mais eficazes e de fácil acesso a populações socioeconomicamente vulneráveis, esta pesquisa aponta novos rumos acerca do efeito dos pós-bióticos sobre uma bactéria de relevância crítica, apontada pela OMS como um problema de saúde pública sério e que requer estudos e ações de controle.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO

Os pós-bióticos provenientes de *Lactobacillus reuteri* e *Lactobacillus rhamnosus* demonstraram capacidade de prejudicar o crescimento de *P. aeruginosa in vitro*, conforme evidenciado pelos ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM), realizados neste estudo. Além disso, o Butirato de sódio também exibiu efeito prejudicial ao crescimento *in vitro* de *P. aeruginosa*, empregando a metodologia de Concentração Mínima Inibitória (CIM).

Em atenção aos objetivos propostos nesta pesquisa, foi possível determinar o efeito e as concentrações inibitórias mínimas que afetam o crescimento *in vitro* de *P. aeruginosa*.

Os dados apontam que, na escala de redução de até 50%, as concentrações de **50, 25 e 12,5%** (v/v) do pós-biótico provenientes de *L. reuteri* foram capazes de reduzir o crescimento de *P. aeruginosa* em **92,89%, 75,07%** e **52,32%** respectivamente. Sendo essas concentrações com melhores resultados.

Para o pós-biótico de *L. rhamnosus* foi observado uma redução de **92,73%** na concentração de 50% v/v, na concentração de 25% v/v houve redução de **70,34%**. As demais concentrações testadas inibiram abaixo de 50% do crescimento em relação ao controle primário.

Já nos testes envolvendo o NaBut, houve redução no crescimento de *P. aeruginosa* nas concentrações de **50 mM, 25 mM, 12,5 mM e 6,25 mM**. No CIM 1 ocorreu redução no crescimento de *P. aeruginosa* de **39,73%** na concentração de 50 mM (poço 1), na concentração de 25 mM (poço 2) houve redução de **38,12%** no crescimento, na concentração de 12,5 mM (poço 3) houve redução de **20,30%**, na concentração de 6,25 mM (poço 4) houve redução de **9,9%**.

Entretanto, no CIM 2 de Nabut houve redução no crescimento de *P. aeruginosa* de **56,43%** na concentração de 50 mM (poço 1), na concentração de 25 mM (poço 2) houve redução de **35,04%** no crescimento, concentração de 12,5 mM (poço 3) houve redução de **16,27%**, na concentração de 6,25 mM (poço 4) houve redução de **7,96%**.

Fazendo uma média geral do Nabut, ocorreu inibição de *P. aeruginosa* de **48,4%** na concentração de 50 mM (poço 1), na concentração de 25 mM (poço 2) houve redução de **35,35%** no crescimento, concentração de 12,5 mM (poço 3) houve redução de **18,15%**, na concentração de 6,25 mM (poço 4) houve redução de **8,9%**.

Apesar de a literatura documentar os efeitos positivos dos pró-bióticos e do NaBut, observa-se uma lacuna de informações no que tange ao emprego de pós-bióticos. Esta pesquisa se torna, então, oportuna não apenas devido à abordagem da temática e escolha dos métodos, mas também pela escolha do patógeno alvo, haja vista seu importante impacto no tocante à resistência microbiana. *P. aeruginosa* é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um microrganismo de alerta crítico para novas abordagens terapêuticas.

Em conclusão, os dados provenientes deste estudo apontam que os pós-bióticos podem emergir como uma estratégia terapêutica **não-medicamentosa**, caracterizada por melhor economicidade e, possivelmente, por se tratar de um estrato plural de compostos orgânicos, teria um impacto notavelmente menor sobre a seleção de linhagens resistentes em comparação com os antimicrobianos atualmente em uso.

Não obstante, os dados desta pesquisa foram *in vitro* e ainda não foram analisadas as composições dos pós-bióticos investigados. Portanto, são dados iniciais que carecem, além de análises *in vivo*, investigação sobre grupos químicos presentes nos pós-bióticos responsáveis pelos efeitos observados. Espera-se que, em breve, sejam esses os próximos passos objeto de pesquisa do grupo.

## 8. REFERÊNCIAS

AFZAAL, M. et al. Human gut microbiota in health and disease: Unveiling the relationship. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 26 set. 2022.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Comunicado de Risco GVIMS/GGGTES/ANVISA nº01/2021 - Identificação de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenêmicos, produtora de KPC e NDM em serviços de saúde, 2021.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde, 2004.

AGGARWAL, S. et al. Postbiotics: From emerging concept to application. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 6, 21 set. 2022.

AGUILAR-TOALÁ, J. E. et al. Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. **Trends in Food Science & Technology**, v. 75, p. 105–114, maio 2018.

ALÓS, J.-I. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, v. 33, n. 10, p. 692–699, dez. 2015.

ANTIBIOTIC RESISTANCE THREATS IN THE UNITED STATES. In: ANTIBIOTIC RESISTANCE THREATS IN THE UNITED STATES. Stephen B. Thacker COLEÇÃO da Biblioteca CDC. ed. ESTADOS UNIDOS: U.s. department of health and human services centers for disease control and prevention, 2019. Disponível em: [doi.org/10.15620/cdc:82532](https://doi.org/10.15620/cdc:82532). Acesso em: 19 out. 2021.

ARAUJO, C. PÓS-BIÓTICOS VERSUS FUNGOS: AVALIAÇÃO INIBITÓRIA in vitro DAS LEVEDURAS *Candida glabrata* E *Cryptococcus neoformans*. [s.l.] Universidade de Brasília- UnB, 29 jan. 2024.

ARSHAD, F.-A. et al. Lactobacilli as Probiotics and their Isolation from Different Sources. **British Journal of Research**, v. 05, n. 03, 2018.

AZAM, M. W.; KHAN, A. U. Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. **Drug Discovery Today**, v. 24, n. 1, p. 350–359, jan. 2019.

BOTELHO, J.; GROSSO, F.; PEIXE, L. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* – Mechanisms, epidemiology and evolution. **Drug Resistance Updates**, v. 44, p. 100640, maio 2019.

BREIDENSTEIN, E. B. M.; DE LA FUENTE-NÚÑEZ, C.; HANCOCK, R. E. W. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 8, p. 419–426, ago. 2011.

CARMO, M. S. DO et al. Lactobacillus fermentum ATCC 23271 Displays In vitro Inhibitory Activities against Candida spp. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 27 out. 2016.

CIOFU, O.; TOLKER-NIELSEN, T. Tolerance and Resistance of Pseudomonas aeruginosa Biofilms to Antimicrobial Agents—How P. aeruginosa Can Escape Antibiotics. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 3 maio 2019.

CORDEIRO, R. DE A. et al. Sodium butyrate inhibits planktonic cells and biofilms of Trichosporon spp. **Microbial Pathogenesis**, v. 130, p. 219–225, maio 2019.

CUEVAS-GONZÁLEZ, P. F.; LICEAGA, A. M.; AGUILAR-TOALÁ, J. E. Postbiotics and paraprobiotics: From concepts to applications. **Food Research International**, v. 136, p. 109502, out. 2020.

DE SOUSA, T. et al. Genomic and Metabolic Characteristics of the Pathogenicity in Pseudomonas aeruginosa. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 23, p. 12892, 29 nov. 2021.

DE OLIVEIRA, D. M. P. et al. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 33, n. 3, 13 maio 2020

DRENKARD, E. Antimicrobial resistance of Pseudomonas aeruginosa biofilms. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 13, p. 1213–1219, nov. 2003.

ESCOLÀ-VERGÉ, L.; LOS-ARCOS, I.; ALMIRANTE, B. Nuevos antibióticos para el tratamiento de las infecciones por microorganismos multirresistentes. **Med. clín (Ed. impr.)**, p. 351–357, 2020.

FACCHIN, S. et al. Microbiota changes induced by microencapsulated sodium butyrate in patients with inflammatory bowel disease. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 32, n. 10, 31 maio 2020.

FAN, Y.; PEDERSEN, O. Gut microbiota in human metabolic health and disease. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, 4 set. 2020.

FEDOROVA, T.V., et al. Atividade antagonista da bactéria ácido láctica Lactobacillus spp. contra isolados clínicos de Klebsiella pneumoniae. **Bioquímica Aplicada e Microbiologia**, 2018, 54: 277-287.

FERNANDES, A. S.; RODRIGUES, S. D. S.; SOUZA, M. G. A. DE. PROBIÓTICOS, PREBIÓTICOS E SIMBIÓTICOS PARA O TRATAMENTO DE CONSTIPAÇÃO EM IDOSOS. **Revista Saúde - UNG-Ser**, v. 15, n. 1/2, p. 51, 5 jul. 2021.

FERNANDES, MARIANE SILVEIRA. **ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DO SOBRENADANTE DE CEPAS DE Lactobacillus CELL-FREE SOBRE ISOLADOS DE Escherichia coli FARMACORRESISTENTES**. Orientador: Prof. Dr. Victor Alves Carneiro. 2019. 63 f. Dissertação (Mestre em Biotecnologia.) - Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa

de Pós graduação em Biotecnologia., Universidade Federal do Ceará, Campus Sobral, 2019.

FIGUEREDO, A. C. F. et al. Pseudomonas aeruginosa: panorama do perfil de resistência aos carbapenêmicos no Brasil / Pseudomonas aeruginosa: overview of the profile of resistance to carbapenems in Brazil. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 1, p. 9661–9672, 25 jan. 2021.

FURUSAWA, Y. et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. **Nature**, v. 504, n. 7480, p. 446–450, 13 nov. 2013.

GALVÃO, ALZ; BRANDÃO, L. de M.; MALHEIROS, AJS; FERNANDES, HC; CASTRO, FF dos S. O alarmante aumento da resistência bacteriana a antimicrobianos. Seria o uso inapropriado deste um fator de influência? . **Revista Brasileira de Revisão de Saúde** , [S. l.] , v. 4, pág. 18589–18602, 2023. DOI: 10.34119/bjhrv6n4-356. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BJHR/article/view/62402>. Acesso em: 11 mar. 2024.

GEORGE-OKAFOR, U.; NWACHUKWU, U.; MIKE-ANOSIKE, E. Screening and Identification of Predominant Lactobacillus spp. from Fermented Milled-Mixed Corn -Soybean Wastes. **International Journal of Scientific & Engineering Research**, v. 9, n. 2, 2018.

HAMAD, G. M. et al. Commercial probiotic cell-free supernatants for inhibition of Clostridium perfringens poultry meat infection in Egypt. **Anaerobe**, v. 62, p. 102181, abr. 2020.

HANCOCK, R. E. W.; SPEERT, D. P. Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa: mechanisms and impact on treatment. **Drug Resistance Updates**, v. 3, n. 4, p. 247–255, ago. 2000.

HIGASHI, B. et al. Effects of fructans and probiotics on the inhibition of Klebsiella oxytoca and the production of short-chain fatty acids assessed by NMR spectroscopy. **Carbohydrate Polymers**, v. 248, p. 116832, nov. 2020.

HILL, C. et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature reviews. Gastroenterology & hepatology**, v. 11, n. 8, p. 506–14, 2014.

HONARPISHEH, P.; BRYAN, R. M.; MCCULLOUGH, L. D. Aging Microbiota-Gut-Brain Axis in Stroke Risk and Outcome. **Circulation Research**, v. 130, n. 8, p. 1112–1144, 15 abr. 2022.

HUANG, F.-C.; LU, Y.-T.; LIAO, Y.-H. Beneficial effect of probiotics on Pseudomonas aeruginosa-infected intestinal epithelial cells through inflammatory IL-8 and antimicrobial peptide human beta-defensin-2 modulation. **Innate Immunity**, v. 26, n. 7, p. 592–600, 28 set. 2020.

JACOB-LOPES, E. et al. A tecnologia de remoção de fósforo: gerenciamento do elemento em resíduos industriais. **Ambiente e Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 9, n. 3, 1 set. 2014.

JEAN, S.-S.; HARNOD, D.; HSUEH, P.-R. Global Threat of Carbapenem-Resistant Gram-Negative Bacteria. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, 15 mar. 2022.

JENSEN, G. S. et al. GanedenBC30™ cell wall and metabolites: anti-inflammatory and immune modulating effects in vitro. **BMC Immunology**, v. 11, n. 1, 24 mar. 2010.

KASAHARA, Y. et al. Novel indole and benzothiophene ring derivatives showing differential modulatory activity against human epithelial sodium channel subunits, ENaC  $\beta$  and  $\gamma$ . **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 83, n. 2, p. 243–250, 1 fev. 2019.

KIM, M. et al. Microbial metabolites, short-chain fatty acids, restrain tissue bacterial load, chronic inflammation, and associated cancer in the colon of mice. **European Journal of Immunology**, v. 48, n. 7, p. 1235–1247, 17 maio 2018.

KIM, S. J.; KIM, G. H.; CHO, H. Postbiotics for cancer prevention and treatment. *Korean Journal of Microbiology*, v. 57, n. 3, p. 142–153, 2021.

KIM, S.-K. et al. Role of Probiotics in Human Gut Microbiome-Associated Diseases. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 9, p. 1335–1340, 28 set. 2019.

KONEMAN, ELMER W. et al. Koneman, diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. 6th. ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2008.

KUMAR, H. et al. Antioxidative potential of *Lactobacillus* sp. in ameliorating D-galactose-induced aging. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 106, n. 13-16, p. 4831–4843, 4 jul. 2022.

LIMA, J. L. DA C. et al. Analysis of biofilm production by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with ventilator-associated pneumonia. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 29, n. 3, 2017.

MAHMMUDI, Z.; GORZIN, A. A. Biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* in Nosocomial Infection. *Journal of Molecular Biology Research*, v. 7, n. 1, p. 29, 9 fev. 2017.

MAINZ, J. G. et al. *Pseudomonas aeruginosa* colonization in the upper and lower airways of a child with cystic fibrosis: a father's meticulous approach to successful eradication. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 45, 14 out. 2019.

MARKOWIAK-KOPEĆ, P.; ŚLIŻEWSKA, K. The Effect of Probiotics on the Production of Short-Chain Fatty Acids by Human Intestinal Microbiome. **Nutrients**, v. 12, n. 4, p. 1107, 16 abr. 2020.

MARTYNIAK, A. et al. Prebiotics, Probiotics, Synbiotics, Paraprobiotics and Postbiotic Compounds in IBD. **Biomolecules**, v. 11, n. 12, p. 1903, 18 dez. 2021.

MISHRA, S. K. et al. Microencapsulation of reuterin to enhance long-term efficacy against food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*. **3 Biotech**, v. 8, n. 1, 18 dez. 2017.

MODIRI, S. et al. Multifunctional Acidocin 4356 Combats *Pseudomonas aeruginosa* through Membrane Perturbation and Virulence Attenuation: Experimental Results Confirm Molecular Dynamics Simulation. **Applied and environmental microbiology**, v. 86, n. 10, 5 maio 2020.

MULCAHY, L. R. et al. Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* Strains Producing High Levels of Persister Cells in Patients with Cystic Fibrosis. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 23, p. 6191–6199, 8 out. 2010.

MU, Qinghui; TAVELLA, Vicente J.; LUO, Xin M. Papel do *Lactobacillus reuteri* na saúde e nas doenças humanas. *Fronteiras em microbiologia*, 2018, 9: 757.

O'TOOLE, P. W.; MARCHESI, J. R.; HILL, C. Next-generation probiotics: the spectrum from probiotics to live biotherapeutics. **Nature Microbiology**, v. 2, n. 5, 25 abr. 2017.

OLIVEIRA, R. D. DE; BUSTAMANTE, P. F. O.; BESEN, B. A. M. P. Tackling healthcare-associated infections in Brazilian intensive care units: we need more than collaboration. **Revista Brasileira De Terapia Intensiva**, v. 34, n. 3, p. 313–315, 2022.

PEIVASTEHR-ROUDSARI, L. et al. Probiotics and food safety: an evidence-based review. **Journal of Food Safety and Hygiene**, 8 ago. 2020.

PRAJAPATI, N. et al. Postbiotic production: harnessing the power of microbial metabolites for health applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, 19 dez. 2023.

QIN, S. et al. *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, Virulence factors, Antibiotic resistance, Interaction with host, Technology Advances and Emerging Therapeutics. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 7, n. 1, 25 jun. 2022.

QUARESMA, D. et al. Detecção de metalo-beta-lactamases em amostras hospitalares de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. **Jornal Brasileiro De Patologia E Medicina Laboratorial**, v. 45, n. 3, 1 jun. 2009.

RAD, A. H. et al. Potential Pharmaceutical and Food Applications of Postbiotics: A Review. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 21, n. 15, p. 1576–1587, 23 dez. 2020.

RAY MOHAPATRA, A.; JEEVARATNAM, K. Inhibiting bacterial colonization on catheters: Antibacterial and antibiofilm activities of bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* SJ33. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 19, p. 85–92, dez. 2019.

RESISTÊNCIA BACTERIANA PELO USO INDISCRIMINADO DE ANTIBIÓTICOS: UMA QUESTÃO DE SAÚDE PÚBLICA | Revista Ibero-

Americana de Humanidades, Ciências e Educação. **periodicorease.pro.br**, 13 dez. 2020.

REZAEI, Z.; SAEID KHANZADI. Biofilm formation and antagonistic activity of *Lactocaseibacillus rhamnosus* (PTCC1712) and *Lactiplantibacillus plantarum* (PTCC1745). **AMB Express**, v. 11, n. 1, 25 nov. 2021.

RODRÍGUEZ-SANTIAGO, J. et al. Polymyxin resistance in Enterobacterales: overview and epidemiology in the Americas. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 58, n. 5, p. 106426–106426, 1 nov. 2021.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, p. 1–16, 2006.

SAEKI, E. K. et al. Pesquisa fenotípica dos fatores de virulência em *Pseudomonas aeruginosa* isolados de água de abastecimento público. **Scientia Plena**, v. 16, n. 6, 28 jul. 2020.

SANGILYANDI GURUNATHAN; PRATHEEP THANGARAJ; KIM, J.-H. Postbiotics: Functional Food Materials and Therapeutic Agents for Cancer, Diabetes, and Inflammatory Diseases. **Foods**, v. 13, n. 1, p. 89–89, 26 dez. 2023.

SANT'ANA, A. DE S. et al. Qualidade microbiológica de águas minerais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 190–194, dez. 2003.

SECRETARIA DE SAÚDE DO GOVERNO FEDERAL (SES), Relatório GRSS n°04-2020 - Análise RM - IRAS 2019.

SILVA, L. O. P. DA; ESTEVAM, L. B.; NOGUEIRA, J. M. DA R. Disseminação da resistência aos antimicrobianos no contexto de saúde única: uma breve revisão. **RBAC**, v. 56, n. 1, 2024.

SHINKAI, S. et al. Immunoprotective effects of oral intake of heat-killed *Lactobacillus pentosus* strain b240 in elderly adults: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **British Journal of Nutrition**, v. 109, n. 10, p. 1856–1865, 5 set. 2012.

SKARIYACHAN, S. et al. Recent perspectives on the molecular basis of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and approaches for treatment and biofilm dispersal. **Folia Microbiologica**, v. 63, n. 4, p. 413–432, 19 jan. 2018.

SOKOL, H. et al. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 43, p. 16731–16736, 20 out. 2008.

STEINER, N. C.; LORENTZ, A. Probiotic Potential of *Lactobacillus* Species in Allergic Rhinitis. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 182, n. 9, p. 807–818, 2021.

STRATEVA, T.; YORDANOV, D. *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. 9, p. 1133–1148, 1 set. 2009.

SZAJEWSKA, H. et al. Use of Probiotics for Management of Acute Gastroenteritis. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 58, n. 4, p. 531–539, abr. 2014.

TAKAGI, R. et al. A Single-Batch Fermentation System to Simulate Human Colonic Microbiota for High-Throughput Evaluation of Prebiotics. **PLOS ONE**, v. 11, n. 8, p. e0160533, 2 ago. 2016.

TEJADA-SIMON, M. V. et al. Ingestion of Yogurt Containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* to Potentiate Immunoglobulin A Responses to Cholera Toxin in Mice. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 4, p. 649–660, abr. 1999.

TORQUATI MADEIRA COSTA, A. RELAÇÕES DESARMÔNICAS ENTRE MICRO-ORGANISMOS: DEMONSTRANDO O EFEITO DE PÓS-BIÓTICOS DE *Lactobacillus* spp. E DO BUTIRATO DE SÓDIO CONTRA *Klebsiella pneumoniae* E *Staphylococcus aureus*. [s.l.] Universidade de Brasília- UnB, 30 jan. 2024.

WANG, B. et al. The Human Microbiota in Health and Disease. **Engineering**, v. 3, n. 1, p. 71–82, fev. 2017.

WANG, M. X. et al. Assessing Larval Zebrafish Survival and Gene Expression Following Sodium Butyrate Exposure and Subsequent Lethal Bacterial Lipopolysaccharide (LPS) Endotoxin Challenge. **Toxins**, v. 15, n. 10, p. 588–588, 23 set. 2023.

WANG, Y. et al. *Lactobacillus acidophilus* and *Clostridium butyricum* ameliorate colitis in murine by strengthening the gut barrier function and decreasing inflammatory factors. **Beneficial Microbes**, v. 9, n. 5, p. 775–787, 18 set. 2018.

WIEËRS, G. et al. Do Probiotics During In-Hospital Antibiotic Treatment Prevent Colonization of Gut Microbiota With Multi-Drug-Resistant Bacteria? A Randomized Placebo-Controlled Trial Comparing *Saccharomyces* to a Mixture of *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, and *Saccharomyces*. **Frontiers in Public Health**, v. 8, 8 mar. 2021.

WILSON, R. M.; WALKER, J. M.; YIN, K. Different Concentrations of *Lactobacillus acidophilus* Cell Free Filtrate Have Differing Anti-Biofilm and Immunomodulatory Effects. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, 13 set. 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO bacterial priority pathogens list, 2024: bacterial pathogens of public health importance, to guide research, development, and strategies to prevent and control antimicrobial resistance**. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2024.

YUE, Y. et al. Probiotic strain *Lactobacillus plantarum* YYC-3 prevents colon cancer in mice by regulating the tumour microenvironment. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 127, p. 110159, jul. 2020.

YUKI MURAI, A. et al. Tratamento de infecções hospitalares causadas pela *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC) com antibióticos da classe das cefalosporinas. *Revista Brasileira de Ciências Biomédicas*, v. 3, n. 1, p. E0652022, 13 nov. 2022.

ZHENG, D.; LIWINSKI, T.; ELINAV, E. Interaction between microbiota and immunity in health and disease. **Cell Research**, v. 30, n. 6, p. 492–506, 20 maio 2020.

ZHENG, J. et al. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2782–2858, 1 abr. 2020.

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

## 9. APÊNDICES - Artigo publicado durante o mestrado

Link para acesso do artigo: [10.46551/ruc.v26n1a9](https://doi.org/10.46551/ruc.v26n1a9)



---



eISSN 2236-5257  
10.46551/ruc.v26n1a9

### Lactobacillus spp. na vanguarda: abordagem terapêutica não-medicamentosa no combate efetivo à *Pseudomonas aeruginosa*

*Frontier of Lactobacillus spp.: non-drug therapeutic approach to effectively combat Pseudomonas aeruginosa*

Lucas Rodrigues da Silva<sup>1</sup>  
Adriane Torquati<sup>2</sup>  
Caroline Araújo<sup>3</sup>  
Samyra Mara Coelho Caxito<sup>4</sup>  
Fabiana Brandão<sup>5</sup>

**RESUMO**

**Introdução:** Neste estudo é abordada a crescente preocupação com a resistência antimicrobiana, causada pelo uso excessivo de antibióticos. Dois grupos bacterianos são destacados: *Pseudomonas aeruginosa*, um agente de IRA altamente resistente a medicamentos, e os pró-bióticos, bactérias benéficas que podem ser usadas como alternativa não medicamentosa. O foco da pesquisa está no gênero *Lactobacillus*, um dos pró-bióticos mais estudados. Essas bactérias demonstram potencial para combater patógenos e modular o sistema imunológico. **Objetivo:** O objetivo do estudo é compilar informações relevantes acerca do efeito dos *Lactobacillus* sobre o crescimento de patógenos. **Método:** Trata-se de uma revisão integrativa, seguindo as diretrizes PRISMA, abrangendo artigos entre os anos de 2017 a 2022. Foram incluídos e analisados 21 estudos. **Resultados:** Diferentes estudos sugerem que os *Lactobacillus* têm efeitos benéficos para o hospedeiro e para microbiota. Além disso, estudos recentes sugerem que os produtos dessas bactérias, denominados pós-bióticos, podem se tornar

---

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Núcleo de Medicina Tropical, Asa Norte, Brasília-DF, 70910-900, Brasil. Email: lucasrodriques9199@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-4977-0050>  
<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília (UnB), Campus de Darcy Ribeiro, Asa Norte, Brasília-DF, 70910-900, Brasil. Email: adriane.torquati@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-2417-7721>  
<sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília (UnB), Campus de Darcy Ribeiro, Asa Norte, Brasília-DF, 70910-900, Brasil. Email: araujo.ap@l@hotmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5010-3277>  
<sup>4</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Campus Darcy Ribeiro, Asa Norte, CEP: 70910-900, Brasília, DF, Brasil. E-mail: samyramacoxito@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4566-7864>  
<sup>5</sup>Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Núcleo de Medicina Tropical, Asa Norte, Brasília-DF, 70910-900, Brasil. Laboratório de Microbiologia e Imunologia Clínica (LabMIC), Departamento de Farmácia, Faculdade de Saúde, Universidade de Brasília, Campus Darcy Ribeiro, Asa Norte, Brasília-DF, 70910-900, Brasil. E-mail: fabiana.brandao@unb.br. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-4338-5067>

Recebido em 06-09-2023	Aceito em 23-10-2023	Publicado em 08-05-2024
---------------------------	-------------------------	----------------------------

---

Unimontes Científica, Montes Claros (MG), Brasil, v. 26, n. 1, p. 1-30, jan/jun. 2024 1



## Lactobacillus spp. na vanguarda: abordagem terapêutica não-medicamentosa no combate efetivo à *Pseudomonas aeruginosa*

*Frontier of Lactobacillus spp.: non-drug therapeutic approach to effectively combat Pseudomonas aeruginosa*

Lucas Rodrigues da Silva<sup>1</sup>  
Adriane Torquati<sup>2</sup>  
Caroline Araújo<sup>3</sup>  
Samyra Mara Coelho Caxito<sup>4</sup>  
Fabiana Brandão<sup>5</sup>

### RESUMO

**Introdução:** Neste estudo é abordada a crescente preocupação com a resistência antimicrobiana, causada pelo uso excessivo de antibióticos. Dois grupos bacterianos são destacados: *Pseudomonas aeruginosa*, um agente de IRA altamente resistente a medicamentos, e os pró-bióticos, bactérias benéficas que podem ser usadas como alternativa não medicamentosa. O foco da pesquisa está no gênero *Lactobacillus*, um dos pró-bióticos mais estudados. Essas bactérias demonstram potencial para combater patógenos e modular o sistema imunológico. **Objetivo:** O objetivo do estudo é compilar informações relevantes acerca do efeito dos *Lactobacillus* sobre o crescimento de patógenos. **Método:** Trata-se de uma revisão integrativa, seguindo as diretrizes PRISMA, abrangendo artigos entre os anos de 2017 a 2022. Foram incluídos e analisados 21 estudos. **Resultados:** Diferentes estudos sugerem que os *Lactobacillus* têm efeitos benéficos para o hospedeiro e para microbiota. Além disso, estudos recentes sugerem que os produtos dessas bactérias, denominados pós-bióticos, podem se tornar

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Núcleo de Medicina Tropical, Asa Norte, Brasília-DF, 70910-900, Brasil. Email: lucasrodrigues091998@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4972-0909>.

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília (UnB), Campus de Darcy Ribeiro, Asa Norte, Brasília-DF, 70910-900, Brasil. Email: drixadrianetorquati@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7517-7271>.

<sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília (UnB), Campus de Darcy Ribeiro, Asa Norte, Brasília-DF, 70910-900, Brasil. Email: araujo.cp@hotmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9030-2277>.

<sup>4</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Campus Darcy Ribeiro, Asa Norte, CEP: 70910-900, Brasília, DF, Brasil. E-mail: samyramccaxito@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4266-2964>.

<sup>5</sup>Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Núcleo de Medicina Tropical, Asa Norte, Brasília-DF, 70910-900, Brasil. Laboratório de Microbiologia e Imunologia Clínica (LabMIC), Departamento de Farmácia, Faculdade de Saúde, Universidade de Brasília, Campus Darcy Ribeiro, Asa Norte, Brasília-DF, 70910-900, Brasil. E-mail: fabianabrandao@unb.br. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8358-8062>.

Recebido em

06-09-2023

Aceito em

23-10-2023

Publicado em

08-05-2024

promissores para controlar o crescimento e a colonização de *P. aeruginosa*. **Conclusão:** *Lactobacillus* e seus produtos demonstram serem seguros para uso em humanos, mas seus efeitos benéficos podem ser específicos para determinadas espécies, especialmente no controle de *P. aeruginosa*. Pré, pró e pós-bióticos podem ser complementos valiosos para abordagens clínicas no combate a infecções bacterianas, especialmente as causadas por *P. aeruginosa*.

**Palavras-chave:** *Lactobacillus*; *Pseudomonas*; Pré-bióticos; Pró-bióticos; Pós-bióticos.

## ABSTRACT

**Introduction:** This study addresses the growing concern of antimicrobial resistance, driven by the excessive use of antibiotics. Two bacterial groups are highlighted: *Pseudomonas aeruginosa*, a highly drug-resistant agent in healthcare-associated infections (HAI), and probiotics, beneficial bacteria that can serve as a non-pharmaceutical alternative. The research focuses on the *Lactobacillus* genus, one of the most extensively studied probiotics. These bacteria show potential in combating pathogens and modulating the immune system. **Objective:** The study aims to compile relevant information on how *Lactobacillus* bacteria impact pathogen growth. **Method:** This is a systematic review following PRISMA guidelines, encompassing articles from 2017 to 2022. A total of 21 studies were included and analyzed. **Results:** Findings indicate that *Lactobacillus* has beneficial effects on the host and microbiota. Moreover, recent studies suggest that products derived from these bacteria, referred to as postbiotics, could be employed as a therapy to control the growth and colonization of *P. aeruginosa*. **Conclusion:** *Lactobacillus* and its products appear to be safe for human use, but their beneficial effects may be species-specific, particularly in controlling *P. aeruginosa*. Pre-, pro-, and postbiotics can serve as valuable adjuncts to clinical approaches in combating bacterial infections, especially those caused by *P. aeruginosa*.

**Keywords:** *Lactobacillus*; *Pseudomonas*; Prebiotics; Probiotics; Postbiotics.

## INTRODUÇÃO

### **Infecções relacionadas à assistência e sua relação com *Pseudomonas aeruginosa***

As infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) têm gerado relevantes impactos na saúde pública mundial. As IRAS provocam aumento da morbidade e da mortalidade de pacientes, resultando em danos sociais aos sistemas de saúde em diferentes países e territórios.<sup>1</sup> Neste contexto, destacam-se os micro-organismos multirresistentes, aqueles que desenvolvem ou adquirem resistência a variados grupos de antimicrobianos, ocasionando significativas complicações na terapêutica, principalmente de indivíduos imunossuprimidos.<sup>2</sup>

Dentre os micro-organismos de maior relevância clínica, destaca-se *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), um patógeno humano oportunista responsável por infecções agudas e crônicas.<sup>3</sup> É notória a persistência desta bactéria em ambientes clínicos, dada sua extraordinária plasticidade adaptativa e variado perfil de resistência aos antibióticos. *P. aeruginosa* é frequentemente associada a Infecções Relacionadas a Assistência (IRAS) como pneumonia, infecções do trato urinário e bacteremia, principalmente em pacientes imunocomprometidos.<sup>4</sup> Essa bactéria é considerada a principal causa de pneumonia associada à ventilação mecânica nas Unidades de Tratamento Intensivo (UTI).<sup>5</sup> É também o micro-organismo mais prevalente em pacientes com fibrose cística.<sup>6</sup>

### ***P. aeruginosa* — biologia e virulência**

*P. aeruginosa* é um bacilo gram-negativo aeróbico e não fermentador da glicose, que não produz esporos. Essa bactéria possui fatores de virulência importantes, como: motilidade, invasinas, adesinas, toxinas e propriedades antifagocitárias. A motilidade se divide em 3 tipos, *swarming*, *swimming* e *twitching*. As invasinas, como a protease alcalina, auxiliam na capacidade antifagocitária e na degradação de proteínas do hospedeiro.<sup>7</sup> Às fimbrias atuam como adesinas, e as toxinas exoenzima S e exotoxina A promovem dano tecidual e escape fagocitário.<sup>8</sup>

Dentre os fatores de virulência mais relevantes se destaca o potencial de formação de biofilmes. Biofilmes são produzidos por micro-organismos que se desenvolvem de forma “agregada”, habitualmente em superfícies bióticas ou abióticas, “embebidos” em uma matriz

tridimensional composta por substâncias poliméricas extracelulares (EPS), sintetizadas pelo próprio micro-organismo.<sup>9, 10</sup>

### ***P. aeruginosa* — resistência a antibióticos de uso clínico**

*P. aeruginosa* apresenta diferentes mecanismos para resistir a agentes antimicrobianos. Os mecanismos de resistência são conferidos por: resistência intrínseca, adquirida ou adaptativa. As dificuldades no tratamento de infecções por esses micro-organismos são atribuídas a expressão de genes relacionados a tais mecanismos.<sup>8</sup>

A resistência adquirida ocorre mediante a transmissão horizontal de genes e mutações genéticas cromossomiais. Todavia, a resistência adquirida pode ser impulsionada em respostas a substâncias antimicrobianas.<sup>8</sup>

Dentre os mecanismos de resistência intrínseca, vale pontuar a alteração da permeabilidade da membrana, hiperexpressão de sistema de efluxo e pela síntese de proteínas de ligação à penicilina, por afinidade com  $\beta$ -lactâmicos.<sup>11</sup> *P. aeruginosa* possui todos esses mecanismos e alarmantemente todos esses podem coexistir simultaneamente.<sup>12</sup>

*P. aeruginosa* expressa resistência intrínseca a variadas classes de antibióticos de uso clínico, como exemplo as cefalosporinas de 1ª e 2ª gerações, ampicilina e ertapenem. Alguns dos mecanismos que geram resistências já foram elucidados, como a resistência aos carbapenêmicos, que se dá mediante expressão de genes que codificam uma enzima produtora de metalo-beta-lactamase, resultando tratamentos contra infecções ocasionadas por esse micro-organismo ainda mais difíceis.<sup>13-15</sup> Devido ao exacerbado número de surtos e ao aumento da mortalidade, os órgãos de vigilância sanitária propõem que haja rastreamento e controle destes perfis de resistência.<sup>16</sup>

### ***P. aeruginosa* — aspectos epidemiológicos**

No tocante aos aspectos epidemiológicos, um panorama atualizado das infecções ocasionadas por *P. aeruginosa* são alarmantes. No Brasil, *P. aeruginosa* vem sendo importante causador de IRA, sendo considerado o patógeno mais prevalente associado a pneumonia e o terceiro em infecção primária da corrente sanguínea em unidades de terapia intensiva (UTI).<sup>3,17</sup>

Na UTI adulto, demonstrou ser o 5º principal micro-organismo em infecções primárias de corrente sanguínea confirmada laboratorial (IPCSL). Entretanto, em infecções do trato urinário associada a cateter vesical de demora (ITU-AC) demonstrou ser o 2º principal micro-organismo. Em UTI pediátrica demonstrou ser 9º em IPCSL e 3º em ITU-AC. Em IPCSL em UTI neonatal é o 11º micro-organismo mais prevalente.<sup>18</sup>

Ainda, em UTI adulto, *P. aeruginosa* corresponde a 63,3% da resistência aos carbapenêmicos em pacientes com IPCSL e 63,6% em pacientes com ITU-AC, mas não apresentaram resistência à polimixina. Nas UTI pediátricas, tanto em pacientes com IPCSL quanto ITU-AC, não demonstrou resistência para os carbapenêmicos e polimixinas. Em UTI neonatal apresentou 33,3% de resistência aos carbapenêmicos e não apresentou resistência à polimixina.<sup>18</sup>

## **Abordagens terapêuticas não-medicamentosas**

### **Pré-bióticos**

Por definição, pré-bióticos são carboidratos não digeridos, fermentados pela microbiota intestinal para 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. A atividade metabólica *inter* e *intra* reinos/classes sobre os pré-bióticos contribuem indiretamente no desenvolvimento e modulação do sistema imunológico, evitando o alojamento de patógenos no intestino.<sup>19</sup>

O butirato de sódio (NaBut) é um ácido graxo de cadeia curta (AGCC) produto da fermentação de bactérias pró-bióticas presentes no cólon, a partir de fibra alimentar não digerida.<sup>20</sup> O NaBut apresenta propriedades anti-inflamatórias e anticancerígenas, além de seu papel como modulador epigenético em fungos patogênicos.<sup>20</sup>

### **Pró-bióticos**

Pró-bióticos são micro-organismos que, quando presentes no organismo em quantidades proporcionais, promovem defesa e melhoria na resposta imunitária. Bactérias do gênero *Lactobacillus* são amplamente empregadas como suplementos alimentares pró-bióticos. Dados apontam que a presença desses pró-bióticos na mucosa intestinal promove melhor resposta do

sistema imune frente a micro-organismos patogênicos invasores ou oportunistas, além de promoverem melhora na permeabilidade intestinal.<sup>21</sup>

### **Pós-bióticos**

Pós-bióticos, termo mais recente, são os produtos do metabolismo de bactérias intestinais, que a partir da liberação de componentes no meio é possível observar suas atividades anti-inflamatória, imunomoduladora e até mesmo moderadora de colesterol e obesidade.

Em um paralelo entre pró e pós-bióticos, em relação a sítio de atuação e viabilidade, parece que os pós-bióticos sobressaem .

A multiplicidade de estudos investigando a função pró-biótica define-os como micro-organismos “auxiliares” do sistema imunológico, seguros e benéficos ao organismo humano. Entretanto, é questionável a sua viabilidade até chegar no seu local de principal ação, devido às etapas que enfrentam ao serem ingeridos na dieta.<sup>22</sup>

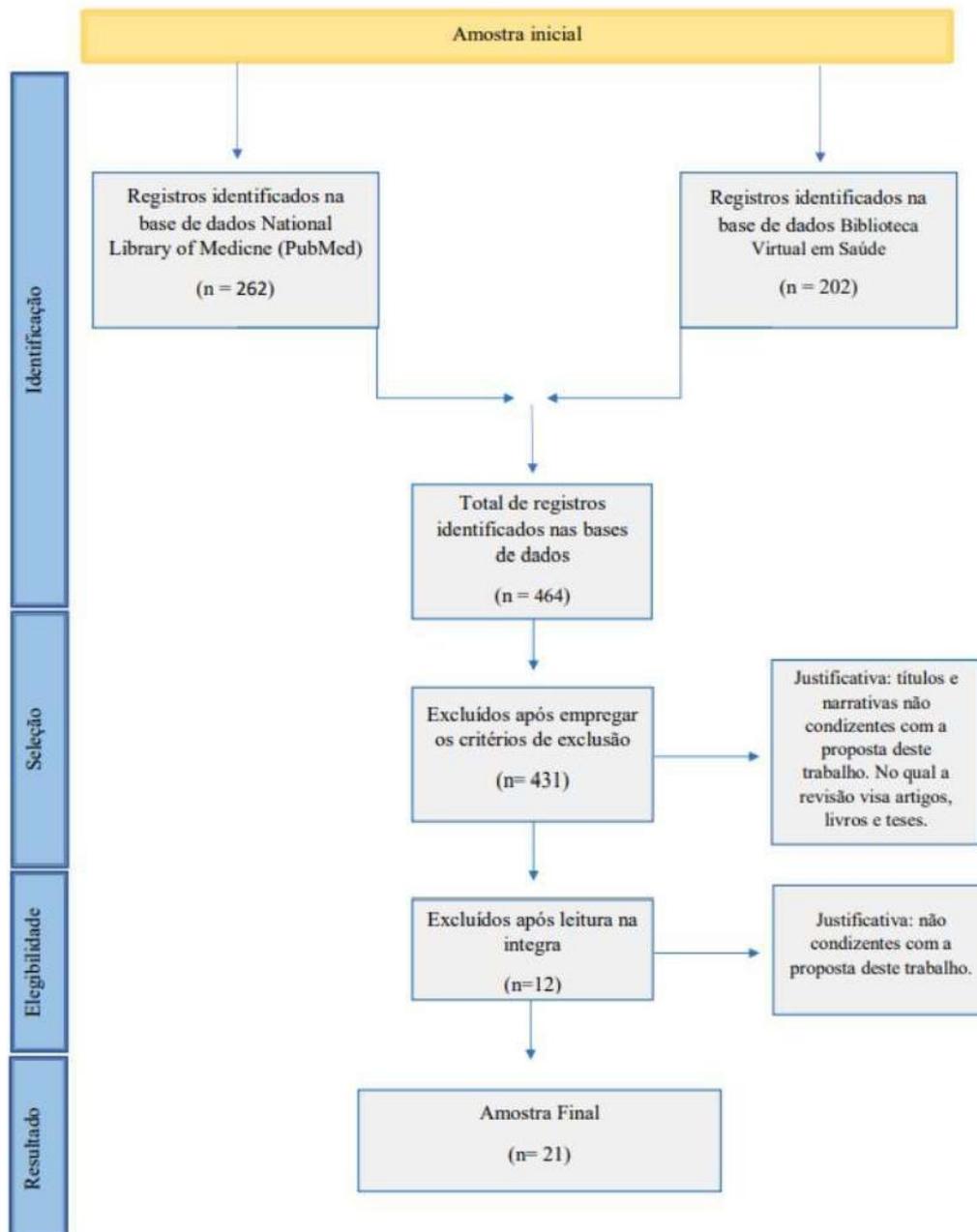
Em contraposição, os pós-bióticos demonstram capacidade de alcançar o intestino mantendo suas funções íntegras, o que os tornam mais estáveis e com melhor chance de “sucesso terapêutico”, em relação aos pró-bióticos. Dados sugerem sua eficácia e aponta como uma nova abordagem terapêutica que poderá auxiliar na descolonização de micro-organismos invasores, além de “abrir” para uma ampla aplicabilidade.<sup>22</sup>

Por fim, a proposta desta pesquisa em avaliar o potencial inibitório de *Lactobacillus* spp., seja por sua ação direta ou indireta sobre outro micro-organismo, remete a hipótese das relações ecológicas entre os seres vivos: harmônicas ou desarmônicas. A competição por nutrientes e espaço entre micro-organismos resulta na colonização de algumas espécies em detrimento de outras. Neste contexto, este estudo tem em vista explorar o potencial da relação desarmônica entre *Lactobacillus* spp. e *P. aeruginosa*, na tentativa de levantar evidências que justifiquem novos estudos que sugiram o uso de pré-bióticos, pró-bióticos e/ou pós-bióticos como **abordagem terapêutica não medicamentosa**. Uma abordagem com menor impacto sobre a seleção de linhagens resistentes, além de ampliar as chances de desfecho clínico favorável.

## MÉTODO

Trata-se de uma revisão integrativa com buscas de trabalhos científicos publicados no período entre 2017 a 2022. As consultas foram realizadas no primeiro semestre de 2023, nas bases de dados da *National Library of Medicine (PubMed)* e Biblioteca Virtual em Saúde (BVS). O processo de seleção dos artigos para análise de conteúdo foi baseado nos critérios de identificação, seleção, inclusão e exclusão seguindo o método PRISMA.<sup>23</sup> Foram empregados os seguintes descritores: “*Lactobacillus* and *Pseudomonas aeruginosa*”, “*Lactobacillus supernatant* and *Pseudomonas*” e “Butyrate sodium and *lactobacillus* combination”, usando o conectivo “AND”. Os critérios de inclusão analisaram a relevância de estudos que relatam a atividade microbicida do extrato de *Lactobacillus* na presença de bactérias e efeito do sobrenadante puro e em comparação ao uso de antibióticos. Os critérios de exclusão constituíram-se da repetição de artigos na base de dados, títulos e resumos que não contribuem com o tema abordado nesta revisão e trabalhos sem acesso livre (**Figura 1**).

**Figura 1.** Fluxograma PRISMA apresentando esquema de identificação e elegibilidade dos artigos, 2023.



**Fonte:** próprio autor (2023).

## RESULTADOS

Foram incluídos 21 estudos (Figura 1) que contemplam a proposta desta revisão. Na etapa inicial, foram identificados 262 artigos no *PubMed* e 202 artigos na BVS. Após a busca, avaliou-se a duplicação de títulos, excluindo-se 19 artigos duplicados; em seguida, efetuou-se a análise dos títulos e resumos, considerando-se a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão.

De modo a explorar e discutir melhor, os estudos incluídos foram compilados na **tabela 1** a seguir. A construção dessa tabela foi arquitetada em tópicos: título pertencente ao artigo, autor/ano, pós-biótico e/ou pró-biótico, objetivo conforme descrito no estudo original e o resumo geral dos resultados obtidos.

**Tabela 1.** Compilado dos estudos incluídos, conforme o título, autor/ano, pós-biótico e/ou pró-biótico, objetivos e resultados, organizados em ordem alfabética ascendente.

Título	Autor/Data	Pós-biótico e/ou Pró-biótico	Objetivo	Inferência
Application of <i>Lactobacillus gasseri</i> 63 AM supernatant to <i>Pseudomonas aeruginosa</i> -infected wounds prevents sepsis in murine models of thermal injury and dorsal Excision	LENZMEIER et al., 2019 <sup>24</sup>	Pró-bióticos e pós-bióticos	Buscou-se a elaboração de uma abordagem terapêutica a base de probióticos, para o tratamento de infecções tóxicas por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	<i>Lactobacillus gasseri</i> inibiu crescimento de <i>P. aeruginosa</i> , impedindo o crescimento de biofilmes e eliminando os biofilmes parciais desenvolvidos.
Bacteriocin Production by <i>Lactobacilli</i> and their role as antibacterial tool	YOUNAS et al., 2022 <sup>25</sup>	Pós-bióticos	Triagem de probióticos (LAB) de amostras de carne de aves e picles de diferentes	A atividade antibacteriana foi verificada contra <i>P.</i>

<p>against common pathogens</p>			<p>fontes, para identificar e caracterizar <i>Lactobacillus</i> por testes bioquímicos e bioensaios, produção de bacteriocina e detectar genes que codificam bacteriocina em <i>Lactobacillus</i> spp. verificar a atividade antibacteriana de espécies de <i>Lactobacillus</i> contra bactérias patogênicas.</p>	<p><i>aeruginosa</i>, <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i>. Dessas, cinco cepas encontradas na carne de frango e seis cepas de pickles mostraram atividade antibacteriana de oito cepas contra bactérias patogênicas.</p>
<p>Bacteriocins: Properties and potential use as antimicrobials</p>	<p>DARBANDI et al., 2022 <sup>26</sup></p>	<p>Pró-bióticos e pós-bióticos</p>	<p>Revisar a literatura sobre as propriedades das bacteriocinas como substituto da antibioticoterapia, seus efeitos antibacterianos em patógenos transmitidos por alimentos, seu impacto em bactérias resistentes a antibióticos e a identificação e extração de novas bacteriocinas contra patógenos intestinais.</p>	<p>Os resultados deste estudo descrevem as bacteriocinas como suplementos para antibióticos devido à sua alta estabilidade, sem efeitos colaterais e potencial para induzir um efeito sinérgico. Em combinação</p>

				<p>com antibióticos, as bacteriocinas atuam sinergicamente. Eles não apenas aumentam a eficiência dos antibióticos e evitam o surgimento de espécies resistentes, mas também reduzem os efeitos colaterais dos antibióticos, diminuindo a concentração necessária para eliminar as bactérias.</p>
<p>Beneficial effect of probiotics on <i>Pseudomonas aeruginosa</i>-infected intestinal epithelial cells through inflammatory IL-8 and antimicrobial peptide human beta-defensin-2 modulation</p>	<p>HUANG et al., 2020<sup>27</sup></p>	<p>Pró-biótico</p>	<p>Investigar como os probióticos atuam sobre a IL-8 e beta – defensina humana 2 (hBD-2) em células do epitélio intestinal infectados por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.</p>	<p>Probióticos aumentaram a expressão de Hbd-2 e suprimiram a resposta de IL-8, quando administraram após a infecção por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>. Houve também o</p>

				aumento da proteína NOD1 induzida por <i>P. aeruginosa</i> e ativação de Akt.
Biofilm formation and antagonistic activity of <i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> (PTCC1712) and <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (PTCC1745)	REZAEI et al., 2021 <sup>28</sup>	Pós-biótico	Descrever atividade inibitória de sobrenadante livre de células (CFS), células planctônicas, e forma de biofilmes de cepas de <i>Lactobacillus</i> ( <i>L. rhamnosus</i> e <i>L. plantarum</i> ) contra patógenos alimentares como <i>P. aeruginosa</i> e <i>Listeria monocytogenes</i> .	48h de incubação foi o melhor tempo para produzir biofilme. <i>L. monocytogenes</i> diminuiu cerca de 4,5 logs em comparação com o controle, e <i>P. aeruginosa</i> redução de crescimento de cerca de 2,13 log. a formação de biofilme de <i>L. monocytogenes</i> na presença de CFS de <i>L. rhamnosus</i> foi mais fraca do que <i>L. plantarum</i> CFS, mas seu efeito CFS na redução da

				população de <i>P. aeruginosa</i> foi o mesmo.
Comparison of the effects of <i>Lactobacillus plantarum</i> versus imipenem on infected burn wound healing	MOGHADAM et al., 2020 <sup>29</sup>	Pró-biótico e Pós-biótico	Comparar os efeitos de <i>L. plantarum</i> na forma de pellet celular bacteriano, sobrenadante e combinação de ambos, bem como o uso de imipenem, como estratégias terapêuticas para queimaduras infectadas de ratos.	Indicam que <i>L. plantarum</i> e seus subprodutos podem ser usados como uma alternativa aos antibióticos para tratar infecções ulcerosas causadas por bactérias resistentes.
Development of guar gum-based dual-layer wound dressing containing <i>Lactobacillus plantarum</i> : Rapid recovery and mechanically flexibility	KIM et al., 2022 <sup>30</sup>	Pró-biótico	Desenvolver um curativo de camada dupla (DLD) carregado com <i>Lactobacillus plantarum</i> com excelente recuperação de feridas e propriedades mecânicas.	<i>L. plantarum</i> lábil ao calor foi carregado com sucesso no DLD à base de goma de guar. Além disso, DLD à base de goma de guar contendo <i>L. plantarum</i> exibiu capacidade de intumescimento e elasticidade significativamente

				melhoradas em comparação com uma única camada de hidrogel.
Different Concentrations of <i>Lactobacillus acidophilus</i> cell free filtrate have differing anti-biofilm and immunomodulatory effects	WILSON et al., 2021 <sup>31</sup>	Pró-biótico e Pós-biótico	Mostrar que <i>Lactobacillus acidophilus</i> é antimicrobiano e imunomodulador.	Fornecem evidências de que diferentes concentrações de <i>L. acidophilus</i> CFF possuem vários efeitos bactericidas, anti-biofilme e imunomoduladores. Isso é importante in vivo para avaliar o possível uso de <i>L. acidophilus</i> CFF em diferentes condições.
Do probiotics during in-hospital antibiotic treatment prevent colonization of gut microbiota with multi-drug-resistant bacteria? A randomized placebo-	WIEËRS et al., 2021 <sup>32</sup>	Pró-bióticos	Determinar se o tratamento com probióticos durante um tratamento com antibióticos poderia prevenir a colonização da microbiota intestinal com bactérias	O tratamento com a mistura pró-biótica levou a um declínio significativo na colonização com

<p>controlled trial comparing <i>Saccharomyces</i> to a mixture of <i>Lactobacillus</i>, <i>Bifidobacterium</i>, and <i>Saccharomyces</i></p>			<p>multirresistentes.</p>	<p><i>Pseudomonas</i> após o tratamento antibiótico.</p>
<p>Gastrointestinal microbiota disruption and risk of colonization with carbapenem-resistant <i>Pseudomonas aeruginosa</i> in intensive care unit patients</p>	<p>PETTIGREW et al., 2019 <sup>33</sup></p>	<p>Não informa</p>	<p>Descrever a microbiota gastrointestinal de pacientes de UTI. Examinar o impacto de antibióticos e outros medicamentos na microbiota GI e identificar marcadores taxonômicos associados à aquisição da colonização CRPA no trato GI.</p>	<p>Pacientes de UTI apresentaram baixos níveis de diversidade e alta abundância relativa de patobiontes. Piperacilina-tazobactam foi prescrito com mais frequência para pacientes com aquisição de colonização CRPA do que aqueles sem.</p>
<p>Inhibiting bacterial colonization on catheters: Antibacterial and antibiofilm activities of bacteriocins from <i>Lactobacillus plantarum</i> SJ33</p>	<p>MOHAPATRA &amp; JEEVARATNA 2019 <sup>34</sup></p>	<p>Pós-biótico</p>	<p>Avaliou o método preciso de purificação da bacteriocina de <i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>argenteratensis</i> SJ33, e sua caracterização e eficácia na inibição do biofilme em</p>	<p>Bacteriocina exibiu atividade de amplo espectro contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, e</p>

			cateteres urinários revestidos com bacteriocina.	<p>a análise SEM revelou a formação de poros na membrana.</p> <p>Ao tratar com várias enzimas, a bacteriocina mostrou-se sensível a proteases, o que confirmou sua natureza proteica. A bacteriocina mostrou sua aplicabilidade e em pH ácido no trato urinário. A atividade antibiofilme da bacteriocina estabeleceu sua importância na inibição do biofilme associada ao cateter contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>.</p>
Inhibitory effect of <i>Lactobacillus</i>	DALLAL et al., 2017 <sup>35</sup>	Pós-biótico	Determinar as propriedades	Os lactobacilos

<p><i>plantarum</i> and <i>Lb. fermentum</i> isolated from the faeces of healthy infants against non-fermentative bacteria causing nosocomial infections</p>			<p>antagônicas de <i>Lactobacillus plantarum</i> e <i>L. fermentum</i> isolado das fezes de crianças saudáveis contra bactérias não fermentadoras causadoras de infecções nosocomiais.</p>	<p>tiveram bons efeitos na prevenção do crescimento de <i>A. baumannii</i> e <i>P. aeruginosa</i>.</p>
<p>Lower respiratory tract microbial composition was diversified in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ventilator-associated pneumonia patients</p>	<p>QI et al., 2018<sup>36</sup></p>	<p>Não informado</p>	<p>Caracterizar a microbiota LRT em pacientes com PAV por <i>P. aeruginosa</i> e explorar a relação entre a microbiota e o prognóstico do paciente.</p>	<p>A composição microbiana LRT de pacientes com PAV por <i>P. aeruginosa</i> foi significativamente diferente de pacientes intubados não infectados e mostrou diferenças individuais significativas, formando dois grupos.</p>
<p>Microencapsulation of reuterin to enhance long-term efficacy against food-borne pathogen <i>Listeria monocytogenes</i></p>	<p>MISHRA et al., 2018<sup>37</sup></p>	<p>Pós-biótico</p>	<p>Microencapsular a reuterina produzida pela cepa <i>Lactobacillus reuteri</i> BPL-36 para sua eficácia a longo prazo contra o patógeno de origem alimentar</p>	<p>Indicaram que as características de liberação de reuterina das partículas encapsuladas eram</p>

			<i>Listeria monocytogenes.</i>	dependentes do pH. As características de liberação não foram afetadas pelo armazenamento de reuterina encapsulada a 4°C por 2 semanas.
Multifunctional acidocin 4356 combats <i>Pseudomonas aeruginosa</i> through membrane perturbation and virulence attenuation: Experimental results confirm molecular dynamics simulation	MODIRI et al., 2020 <sup>38</sup>	Pós-biótico	Avaliar um novo peptídeo antimicrobiano isolado de <i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356, para que pudesse ver se teria potencial de neutralização de biofilmes e as células planctônicas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	Os resultados suportam o potencial terapêutico da ACD para o tratamento de infecções por <i>Pseudomonas</i> .
pH-dependent inhibition of AHL-mediated quorum sensing by cell-free supernatant of lactic acid bacteria in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	RANA et al., 2020 <sup>39</sup>	Pós-biótico	Tem como objetivo avaliar a inibição da detecção de quórum mediada por AHL por sobrenadante livre de células de bactérias lácticas em <i>P. aeruginosa</i> .	A forte atividade anti-biofilme e a inibição do <i>quorum sensing</i> causada por bactérias lácticas contra <i>P. aeruginosa</i> podem ser devidas ao pH ácido e à

				<p>presença da forma ativa dos metabólitos. Isso é confirmado pela diminuição na liberação de sinais autoindutores (AHL), expressão de genes autoindutores da sintase (LasI &amp; RhII) e atividade da elastase de <i>P. aeruginosa</i>.</p>
<p>Priming with intranasal <i>Lactobacilli</i> prevents <i>Pseudomonas aeruginosa</i> acute pneumonia in mice</p>	<p>FANGOUS et al., 2021 <sup>40</sup></p>	<p>Pró-biótico</p>	<p>Avaliar os efeitos de isolados clínicos de <i>Lactobacillus in vivo</i>, por meio de administração intranasal, em modelo murino de pneumonia por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.</p>	<p>Foram rastreados <i>in vitro</i> 50 isolados clínicos pulmonares de <i>Lactobacillus</i> quanto à sua capacidade de diminuir a síntese de dois fatores de virulência dependentes de <i>quorum sensing</i> (elastase e piocianina)</p>

				<p>produzidos por <i>P. aeruginosa</i> cepa PAO1. Os resultados demonstraram que a preparação intranasal com lactobacilos atua como profilaxia e evita complicações fatais causadas pela pneumonia por <i>P. aeruginosa</i> em camundongos.</p>
<p>Separate and synergic effects of <i>Lactobacillus uvarum</i> LUHSS245 and arabinogalactan on the in vitro antimicrobial properties as well as on the fecal and metabolic profile of newborn calves</p>	<p>ZAVISTANA VICIUTE et al., 2020 <sup>41</sup></p>	<p>Pró-biótico</p>	<p>Avaliar a influência da cepa <i>Lactobacillus uvarum</i> LUHS245, ARB, e sua combinação em parâmetros de saúde, incluindo bioquímica sanguínea e microbiologia fecal de bezerros recém-nascidos.</p>	<p>A suplementação de LUHS245 e ARB, isoladamente ou em conjunto, reduziu a contagem bacteriana total nas fezes e reduziu as concentrações de lactato e alanina</p>

				aminotransferase sérica no sangue.
Antimicrobial potential of <i>Lactobacillus plantarum</i> strains isolated from Slovak raw sheep milk cheeses	VATAŠČINO VÁ et al., 2020 <sup>42</sup>	Pró-biótico e Pós-biótico	Selecionar as cepas de <i>Lactobacillus plantarum</i> isoladas do tradicional queijo de leite de ovelha cru eslovaco para seu potencial inibitório.	As cepas <i>L. plantarum</i> L5, L19, L20 e L22 mostram suficiente atividade antibacteriana <i>in vitro</i> contra um amplo espectro de patógenos de origem alimentar, incluindo as cepas selvagens de <i>S. aureus</i> .
Sodium butyrate inhibits planktonic cells and biofilms of <i>Trichosporon</i> spp.	DE AGUIAR CORDEIRO et al., 2019 <sup>43</sup>	Pós-bióticos	Avaliar o efeito do butirato de sódio (NaBut) - um fármaco inibidor da histona desacetilase - sobre cepas clínicas de <i>Trichosporon</i> spp.	Mostrou que o NaBut é um inibidor do crescimento planctônico de <i>T. asahii</i> e <i>T. inkin</i> , interferindo na filamentação de ambas as espécies. Além disso, foi demonstrado que o NaBut afeta a adesão, desenvolvim

				ento e maturação dos biofilmes de <i>T. asahii</i> e <i>T. inkin</i> .
Topical Treatment of Second-Degree Burn Wounds with <i>Lactobacillus plantarum</i> Supernatant: Phase I Trial	MOGHADAM et al., 2022 <sup>44</sup>	Pós-biótico	Investigar se o tratamento com <i>L.plantarum</i> possui potencial antimicrobiano em feridas de segundo grau.	<i>L. plantarum</i> podem ser considerados uma possível opção de tratamento tópico no caso de queimaduras de segundo grau.

Fonte: próprio autor (2023)

## DISCUSSÃO

### *Lactobacillus* e a modulação da microbiota

A disbiose da microbiota intestinal quando se instala ocasiona em efeitos prejudiciais ao hospedeiro. O mecanismo por trás dos malefícios da disbiose ocorre quando micro-organismos que colonizam normalmente aquele sistema (homeostasia) começam a declinar; assim micro-organismos patogênicos assumem aquela área, desestabilizando o equilíbrio. Pacientes internados em UTI apresentam uma microbiota com predomínio de patógenos, fato que pode ser explicado pelo uso de antibióticos ou medicamentos como os opioides.<sup>33</sup>

São inúmeros os estudos acerca de mecanismos de combate a esses variados micro-organismos patogênicos. Uma das estratégias que surgiu e vem ganhando espaço é o uso de *Lactobacillus* spp. como uma nova abordagem terapêutica complementar. Um estudo analisou a administração de cepa de *Lactobacillus uvarum* LUHS245, isolados de centeio integral fermentado, em modelos animais, demonstrando possuir efeito contra patógenos importantes como, por exemplo, o gênero *Pseudomonas*.<sup>41</sup> Ainda, outro estudo aponta que cepas de *L.*

*plantarum* isoladas de queijos apresentaram efeitos sobre micro-organismos causadores de doença em humanos.<sup>42</sup>

Na literatura são descritos efeitos imunomoduladores dos pró-bióticos.<sup>31</sup> Algumas espécies de *Lactobacillus* apresentaram efeito inibidor sobre *P. aeruginosa*, por estímulo do sistema imunológico, por meios de citocinas e expressão de mRNA.<sup>27</sup> No estudo de Fangous e colaboradores (2021)<sup>40</sup> foram testados *priming* de diferentes espécies de *Lactobacillus*, administrados via intranasal em camundongos, resultando em sobrevida dos animais, no qual o sistema imunológico teve alterações como redução no recrutamento de neutrófilos, citocinas e quimiocinas. A produção de IL-10, uma citocina anti-inflamatória, também foi aumentada.

### ***Lactobacillus* spp. — potencial terapêutico**

Isolados de *L. platarum* e *L. fermentum*, proveniente de fezes de crianças, demonstraram efeitos contra crescimentos de patógenos.<sup>35</sup> Estudos empregando sobrenadantes livre de células de *L. rhamnosus* e *L. platarum* conseguiram inibir o crescimento de *P. aeruginosa*. Ademais, essas duas espécies de *Lactobacillus* conseguiram afetar a formação de biofilmes, um fator ainda mais relevante no tocante a colonização de *P. aeruginosa*. Outra bactéria também avaliada no estudo foi *Listeria monocytogenes*.<sup>28</sup>

Em um estudo recente, *P. aeruginosa* demonstrou ser sensível a certos tipos de pós-bióticos. Tal fato foi observado sobre o fator de virulência para *quorum sensing*, mediado por N-acil homoserina lactona (AHL), que na presença de pós-bióticos produzidos por bactérias lácticas como *L. rhamnosus* e *L. fermentum*, teve o mecanismo de *quorum* prejudicado.<sup>39</sup>

A inibição da formação de biofilmes de patógenos relevantes, empregando espécies de *Lactobacillus*, pode ser explicada pela expressão de compostos produzidos e secretados, como as bacteriocinas, um potente antibacteriano, e mecanismos de imunidade específica. A maioria das bacteriocinas são pequenas moléculas catiônicas com características hidrofóbicas ou anfifílicas. O mecanismo pelo qual essas bacteriocinas agem sobre os patógenos são por inibição da biossíntese de parede celular, permeabilidade de membrana citoplasmática e interferindo nas vias metabólicas.<sup>26</sup> É provável que na composição dos pós-bióticos de algumas espécies de *Lactobacillus* haja quantidades expressivas de bacteriocinas, o que poderia explicar parte do efeito observado pelos estudos.

A retuterina é um composto antimicrobiano produzido através da fermentação aeróbica do glicerol. A retuterina, um outro tipo de bacteriocina, demonstrou ter eficácia contra espécies como *E. coli*, *L. monocytogenes* e *P. aeruginosa*.<sup>37</sup>

Outro exemplo de metabólito produzido por espécies de *Lactobacillus*, que apresenta ação antimicrobiana contra *P. aeruginosa*, é a acidocina 4356, um peptídeo antimicrobiano produzido pela espécie *L. acidophilus*, o qual apresenta capacidade de inibição dos fatores de virulências, morte do micro-organismo e degradação de biofilmes.<sup>38</sup>

*Lactobacillus* são investigados em conjunto com diferentes tipos de antibióticos. Estudos já demonstram que espécies de *Lactobacillus* associadas a antibióticos favoreceram o tratamento contra a colonização da microbiota intestinal de bactérias multirresistentes, como, por exemplo, *P. aeruginosa*.<sup>32</sup>

Infecções por *P. aeruginosa* são potencialmente agravantes para pacientes que fazem o uso de ventilação mecânica, devido aos riscos de pneumonia associada à ventilação (PAV). Pacientes com predomínio de *P. aeruginosa* estão relacionados com uma maior tendência a gravidade da pneumonia, enquanto pacientes com predomínio de espécies de *Lactobacillus* estava relacionado a uma melhora do quadro clínico.<sup>36</sup>

Em relação à colonização de cateteres, evidências apontam que cepas de *L. plantarum* SJ33 purificados para posterior obtenção de bacteriocinas, obtiveram efeitos na inibição do crescimento bacteriano e formação de biofilmes de *P. aeruginosa* em cateteres urinários.<sup>34</sup>

Outro relevante, talvez o mais grave, problema ocasionado por *P. aeruginosa* são as infecções em feridas, principalmente em pacientes queimados grupo mais suscetível a essa infecção. O sobrenadante de *L. plantarum* demonstrou auxiliar na cura de feridas proveniente de queimaduras, reduzindo a inflamação e acelerando o processo de cicatrização. Isso por conta do seu potencial imunomodulador e antimicrobiano, indicando que o uso de *L. plantarum* pode ser uma nova alternativa adjuvante ao uso de antibióticos.<sup>29</sup>

*Lactobacillus gasseri* também apresentou efeito contra contaminação/infecção ocasionada por *P. aeruginosa*. O sobrenadante da cepa de *L. gasseri* 63 AM inibiu o desenvolvimento de biofilmes e ainda eliminou os que estavam pré-desenvolvidos, usando a metodologia em microplaca de 24 poços e infectando os modelos murinos com *P. aeruginosa* no local da ferida, observou-se que a cepa de *L. gasseri* 63 AM preveniu a ocorrência de sepse.<sup>24</sup>

Modelos de terapêuticas para os mais diversificados tipos de infecções estão em desenvolvimento. Curativos à base de extratos de *Lactobacillus* é um dos possíveis exemplos de tratamentos “chave” para infecções de micro-organismos que afetam essa região. Estudos indicaram que *L. plantarum*, pela produção de suas bacteriocinas e ácidos orgânicos, auxiliam no efeito antimicrobiano e no processo de cicatrização de feridas, apresentando ser eficaz contra *P. aeruginosa*.<sup>30</sup>

Sobrenadante de *L. plantarum* apresentou ser eficaz em feridas ocasionadas por queimaduras. A elaboração de pomada a base de *L. plantarum* obteve êxito no tratamento em queimaduras de segundo grau, principalmente sobre bactérias multirresistentes (MDR). Verificou-se que o uso desses pós-bióticos, além de ajudar no processo de cicatrização, diminuíram o surgimento de resistência em comparação ao uso com antibióticos.<sup>44</sup>

Em conjunto, os trabalhos analisados evidenciam que os lactobacilos apresentam um potencial terapêutico, podendo ser utilizados em condutas clínicas, principalmente por não acelerar a resistência antimicrobiana e por favorecerem a diminuição dos efeitos negativos causados por patógenos.

#### **Potencial do Butirato de Sódio como agente pré-biótico ou pós-biótico.**

O butirato de sódio (NaBut) é um ácido graxo de cadeia curta, resultado do produto final da fermentação sacarolítica de polissacarídeos complexos, não digeríveis, por bactérias anaeróbicas.<sup>43</sup> Assim, por se tratar do produto do metabolismo de algumas bactérias, ou mesmo por servir de alimento para tais, poderia ser classificado tanto com um pré-biótico ou como um pós-biótico. Além disso, NaBut dispõe de múltiplas propriedades, uma delas é ser um inibidor histona deacetilase, podendo alterar a conformação da cromatina.<sup>44</sup> Testes *in vitro* evidenciaram um papel inibidor de crescimento de determinados micro-organismos, por meio da metodologia de Concentração Inibitória Mínima (CIM). Butirato de sódio também conseguiu inibir a formação de biofilmes de algumas espécies de micro-organismos patogênicos.<sup>44</sup>

Muito embora ainda não haja dados sobre o efeito de NaBut sobre crescimento de *P. aeruginosa*, é evidente que em outros modelos há um potencial inibitório, tanto do crescimento de patógenos, quanto dos fatores de virulência associados. Destarte, dadas as propriedades antioxidantes, antineoplásicas, anti-inflamatórias e antimicrobianas do NaBut<sup>45</sup>, é razoável

pressupor que este composto seria uma abordagem interessante a ser investigada em associação com pós-bióticos de *Lactobacillus* spp. sobre *P. aeruginosa*.

## CONCLUSÃO

Com base nos achados apresentados neste estudo, compreende-se que o uso de *Lactobacillus* spp. é seguro, além de se apresentarem como uma promissora abordagem terapêutica, capaz de auxiliar no controle e tratamento de infecções por micro-organismos resistentes, como as causadas por *P. aeruginosa*.

Dados ainda escassos sugerem que além dos pró-bióticos terem um potencial terapêutico não medicamentoso, seus produtos metabólicos, denominados pós-bióticos, também são promissores para o mesmo fim. Na vanguarda deste tema, os pós-bióticos podem ter amplas vertentes de pesquisa, particularmente por não se tratar de micro-organismos vivos que precisam estarem viáveis para colonizar a região alvo, podendo, assim, serem veiculados em diferentes formulações farmacêuticas. Ademais, pós-bióticos podem conter moléculas com ação antimicrobiana e regulatórias *inter-espécies*.

Não obstante, é imprescindível a necessidade de novos estudos, especialmente estudos clínicos que visem elucidar as propriedades biológicas por trás do tema, de modo a permitir melhor compreensão da interação entre esses micro-organismos e suas funções complementares à saúde.

Indubitavelmente, os pró-bióticos e seus produtos podem ser complementos importantes para auxiliar em abordagens clínicas existentes, especialmente ao considerar o menor impacto da pressão seletiva deste tratamento sobre linhagens resistentes. A relação desarmônica entre *Lactobacillus* spp. e *P. aeruginosa* pode e deve ser mais bem explorada, haja vista que novos fármacos podem ser isolados a partir do estudo molecular da composição dos pós-bióticos de algumas espécies de *Lactobacillus*, capazes de inibir ou reduzir o crescimento deste patógeno.

## AGRADECIMENTOS

A Universidade de Brasília, ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical e ao Laboratório de Microbiologia e Imunologia Clínica (LabMIC) no Departamento de Farmácia - UnB.

## REFERÊNCIAS

1. ARAÚJO, Beatriz Torres; PEREIRA, Daniella Cristina Rodrigues. Políticas para controle de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) no Brasil, 2017. *Comunicação em Ciências da Saúde*, Brasília, v. 28, n. 3/4, p. 333 -342, 2017.
2. ESCOLÁ-VERGÉ, Laura; LOS-ARCOS, Ibai; ALMIRANTE, Benito. Nuevos antibióticos para el tratamiento de las infecciones por microorganismos multirresistentes. *Medicina Clínica*, v. 154, n. 9, p. 351-357, 2020.
3. FIGUEREDO, Ana Catarina Fernandes et al. Pseudomonas aeruginosa: panorama do perfil de resistência aos carbapenêmicos no Brasil. *Brazilian Journal of Development*, v. 7, n. 1, p. 9661-9672, 2021.
4. SKARIYACHAN, Sinosh et al. Recent perspectives on the molecular basis of biofilm formation by Pseudomonas aeruginosa and approaches for treatment and biofilm dispersal. *Folia microbiologica*, v. 63, p. 413-432, 2018.
5. LIMA, Jailton Lobo da Costa et al. Análise da produção de biofilme por isolados clínicos de Pseudomonas aeruginosa de pacientes com pneumonia associada à ventilação mecânica. *Revista Brasileira de terapia intensiva*, v. 310-316, 2017.
6. MAINZ, Jochen Georg et al. Colonização por Pseudomonas aeruginosa nas vias aéreas superiores e inferiores de uma criança com fibrose cística: a abordagem meticulosa de um pai para uma erradicação bem-sucedida. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 45, 2019.
7. SAEKI, Erika Kushikawa et al. Pesquisa fenotípica dos fatores de virulência em Pseudomonas aeruginosa isolados de água de abastecimento público. *Scientia Plena*, v. 16, n. 6, 2020.
8. AZAM, Mohd W.; KHAN, Asad U. Updates on the pathogenicity status of Pseudomonas aeruginosa. *Drug discovery today*, v. 24, n. 1, p. 350-359, 2019.
9. MARONEZE, Mariana Manzoni et al. A tecnologia de remoção de fósforo: Gerenciamento do elemento em resíduos industriais. *Revista Ambiente & Água*, v. 9, p. 445-458, 2014.
10. SILVA, Shênia CFL et al. Qualidade microbiológica de águas minerais. *Food Science and Technology*, v. 23, p. 190-194, 2003.
11. FIGUEIREDO, Deuseli Quaresma de et al. Detecção de metalo-beta-lactamases em amostras hospitalares de Pseudomonas aeruginosa e Acinetobacter baumannii. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 45, p. 177-184, 2009.

12. STRATEVA, Tanya; YORDANOV, Daniel. Pseudomonas aeruginosa—a phenomenon of bacterial resistance. *Journal of medical microbiology*, v. 58, n. 9, p. 1133-1148, 2009.
13. DE OLIVEIRA, David MP et al. Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *Clinical microbiology reviews*, v. 33, n. 3, p. 10.1128/cmr. 00181-19, 2020.
14. JEAN, Shio-Shin; HARNOD, Dorji; HSUEH, Po-Ren. Global threat of carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 12, p. 236, 2022.
15. DE SOUSA, Telma et al. Genomic and Metabolic Characteristics of the Pathogenicity in Pseudomonas aeruginosa. *International journal of molecular sciences*, v. 22, n. 23, p. 12892, 2021.
16. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA), Comunicado de Risco GVIMS/GGGTES/ANVISA nº01/2021.
17. KONEMAN, ELMER W. et al. Koneman, diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. 6th. ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2008.
18. SECRETARIA DE SAÚDE DO GOVERNO FEDERAL (SES), Relatório GRSS nº04-2020 - Análise RM - IRAS 2019.
19. ZHENG, Danping; LIWINSKI, Timur; ELINAV, Eran. Interaction between microbiota and immunity in health and disease. *Cell research*, v. 30, n. 6, p. 492-506, 2020.
20. FURUSAWA, Yukihiko et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*, v. 504, n. 7480, p. 446-450, 2013.
21. BRANDAO, Fabiana AS et al. Histone deacetylases inhibitors effects on Cryptococcus neoformans major virulence phenotypes. *Virulence*, v. 6, n. 6, p. 618-630, 2015.
22. SAAD, Susana Marta Isay. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, p. 1-16, 2006.
23. GALVÃO, Taís Freire; PANSANI, Thais de Souza Andrade; HARRAD, David. Principais itens para relatar Revisões sistemáticas e Meta-análises: A recomendação PRISMA. *Epidemiologia e serviços de saúde*, v. 24, p. 335-342, 2015.
24. LENZMEIER, Taylor D. et al. Application of Lactobacillus gasseri 63 AM supernatant to Pseudomonas aeruginosa-infected wounds prevents sepsis in murine models of thermal injury and dorsal excision. *Journal of medical microbiology*, v. 68, n. 10, p. 1560-1572, 2019.
25. YOUNAS, Samina et al. Bacteriocin Production by Lactobacilli and Their Role as Antibacterial Tool against Common Pathogens. *Journal of Oleo Science*, v. 71, n. 4, p. 541-550, 2022.
26. DARBANDI, Atieh et al. Bacteriocins: Properties and potential use as antimicrobials. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, v. 36, n. 1, p. e24093, 2022.
27. HUANG, Fu-Chen; LU, Yi-Ting; LIAO, Yu-Hsuan. Beneficial effect of probiotics on Pseudomonas aeruginosa–infected intestinal epithelial cells through inflammatory IL-8 and antimicrobial peptide human beta-defensin-2 modulation. *Innate Immunity*, v. 26, n. 7, p. 592-600, 2020.
28. REZAEI, Zeinab; KHANZADI, Saeid; SALARI, Amir. Biofilm formation and antagonistic activity of Lactobacillus rhamnosus (PTCC1712) and Lactiplantibacillus plantarum (PTCC1745). *AMB Express*, v. 11, n. 1, p. 1-7, 2021.
29. MOGHADAM, Somayeh Soleymanzadeh et al. Comparison of the effects of Lactobacillus plantarum versus imipenem on infected burn wound healing. *Medical Journal of the Islamic Republic of Iran*, v. 34, p. 94, 2020.

30. KIM, Jung Suk et al. Development of guar gum-based dual-layer wound dressing containing *Lactobacillus plantarum*: Rapid recovery and mechanically flexibility. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 221, p. 1572-1579, 2022.
31. WILSON, Rachael M.; WALKER, Jean M.; YIN, Kingsley. Different Concentrations of *Lactobacillus acidophilus* cell free filtrate have differing anti-biofilm and immunomodulatory effects. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, p. 864, 2021.
32. WIEËRS, Grégoire et al. Do probiotics during in-hospital antibiotic treatment prevent colonization of gut microbiota with multi-drug-resistant bacteria? A randomized placebo-controlled trial comparing *Saccharomyces* to a mixture of *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, and *Saccharomyces*. *Frontiers in Public Health*, v. 8, p. 578089, 2021.
33. PETTIGREW, Melinda M. et al. Gastrointestinal microbiota disruption and risk of colonization with carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit patients. *Clinical Infectious Diseases*, v. 69, n. 4, p. 604-613, 2019.
34. MOHAPATRA, Amrita Ray; JEEVARATNAM, Kadirvelu. Inhibiting bacterial colonization on catheters: Antibacterial and antibiofilm activities of bacteriocins from *Lactobacillus plantarum* SJ33. *Journal of global antimicrobial resistance*, v. 19, p. 85-92, 2019.
35. DALLAL, MM Soltan et al. Inhibitory effect of *Lactobacillus plantarum* and *Lb. fermentum* isolated from the faeces of healthy infants against nonfermentative bacteria causing nosocomial infections. *New microbes and new infections*, v. 15, p. 9-13, 2017.
36. QI, Xiaoling et al. Lower respiratory tract microbial composition was diversified in *Pseudomonas aeruginosa* ventilator-associated pneumonia patients. *Respiratory Research*, v. 19, n. 1, p. 1-12, 2018.
37. MISHRA, Santosh Kumar et al. Microencapsulation of reuterin to enhance long-term efficacy against food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*. *3 Biotech*, v. 8, p. 1-7, 2018.
38. MODIRI, Sima et al. Multifunctional acidocin 4356 combats *Pseudomonas aeruginosa* through membrane perturbation and virulence attenuation: Experimental results confirm molecular dynamics simulation. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 86, n. 10, p. e00367-20, 2020.
39. RANA, Shikha et al. pH-dependent inhibition of AHL-mediated quorum sensing by cell-free supernatant of lactic acid bacteria in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbial pathogenesis*, v. 142, p. 104105, 2020.
40. FACCHIN, Sonia et al. Microbiota changes induced by microencapsulated sodium butyrate in patients with inflammatory bowel disease. *Neurogastroenterology & Motility*, v. 32, n. 10, p. e13914, 2020.
41. ZAVISTANAVICIUTE, Paulina et al. Separate and synergic effects of *Lactobacillus uvarum* LUHSS245 and arabinogalactan on the in vitro antimicrobial properties as well as on the fecal and metabolic profile of newborn calves. *Animals*, v. 10, n. 4, p. 593, 2020.
42. VATAŠČINOVÁ, T. et al. Antimicrobial potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Slovak raw sheep milk cheeses. *Journal of dairy science*, v. 103, n. 8, p. 6900-6903, 2020.
43. DE AGUIAR CORDEIRO, Rossana et al. Sodium butyrate inhibits planktonic cells and biofilms of *Trichosporon* spp. *Microbial pathogenesis*, v. 130, p. 219-225, 2019.

44. MOGHADAM, Somayeh Soleymanzadeh et al. Topical Treatment of Second-Degree Burn Wounds with *Lactobacillus plantarum* Supernatant: Phase I Trial. *Iranian Journal of Pathology*, v. 17, n. 4, p. 460, 2022
45. PARK, Miri et al. Role of postbiotics in diet-induced metabolic disorders. *Nutrients*, v. 14, n. 18, p. 3701, 2022.
46. FANGOUS, Marie-Sarah et al. Priming with intranasal lactobacilli prevents *Pseudomonas aeruginosa* acute pneumonia in mice. *BMC microbiology*, v. 21, n. 1, p. 1-11, 2021.
47. STUMPF, Friederike. A look at the smelly side of physiology: transport of short chain fatty acids. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, v. 470, n. 4, p. 571-598, 2018.