

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

ADRIANE TORQUATI MADEIRA COSTA

**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***

BRASÍLIA

2024

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

TT687

Torquati Madeira Costa, Adriane
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 / Adriane Torquati Madeira Costa;
orientador Yanna Karla de Medeiros Nóbrega; co-orientador
Fabiana Brandão. -- Brasília, 2024.
75 p.

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

1. Pós-bióticos. 2. *Staphylococcus aureus*. 3. *Klebsiella pneumoniae*. I. de Medeiros Nóbrega, Yanna Karla, orient. II. Brandão, Fabiana, co-orient. III. Título.

ADRIANE TORQUATI MADEIRA COSTA

**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***

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

Orientadora: Profa. Dra. Yanna Karla de Medeiros Nóbrega

Coorientadora: Profa. Dra. Fabiana Brandão

BRASÍLIA

2024

FOLHA DE APROVAÇÃO

ADRIANE TORQUATI MADEIRA COSTA

Título: Relações desarmônicas entre micro-organismos: demonstrando o efeito de pós-bióticos de *Lactobacillus* sp. e Butirato de Sódio contra *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*.

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

Aprovada em 30 de janeiro de 2024

BANCA EXAMINADORA

PRESIDENTE:

Profa. Yanna Karla de Medeiros Nóbrega
Universidade de Brasília (UnB)

MEMBROS:

Profa. Dra. Helaine Carneiro Capucho
Universidade de Brasília (UnB)

Dr. Samuel Dias Araújo Júnior
Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal - SES-DF

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

AGRADECIMENTOS

“Yahweh, Rafá, Elohim, Shaddai, Jireh, Adonai”

Ao grande amor que **PRIMEIRO** nos amou: **Jesus Cristo**, sem ti senhor, nada seria, nada alcançaria, não faria sentido algum alcançar voos altos sem estar na sua presença. Tua misericórdia me alcançou na seleção desse projeto e o senhor me honrou para finalizá-lo com dignidade. Sei que me amas, por ti fui salva e encontrada. Senhor, tu recolheste as minhas lágrimas e forjou meu coração no fogo, e por meio dessa oportunidade me transformou em alguém melhor, para glorificar o seu nome e dizer que a **tua graça nunca falha**. Te amo Jesus, obrigada por ter sido meu principal amigo nessa caminhada e por ter me permitido viver o extraordinário.

Aos meus amores, **Francimere Silva Madeira** e **Manoel Messias**. Mãe, são tantas coisas que tenho para lhe agradecer, mas a principal delas é: obrigada por me apoiar nos meus sonhos, abrir mão de tantas coisas para me ver crescer com conforto e dignidade, obrigada por ser minha melhor amiga, confidente, fiel escudeira, a minha maior fã (sou sua maior fã também meu amor), minha base, meu ar, meu chão. Sempre vou correr para o seu colo quando precisar de estrutura e sempre voltarei mais forte, pois seu amor é o meu alicerce. Eu te amo para sempre. Paidrasto, obrigada por ser esse homem incrível, um bom homem, leal, amigo, gentil e muito respeitador e muito obrigada por você ser um excelente cozinheiro e ter feito muitas das minhas refeições quando a mamãe estava no trabalho, e eu precisava estudar horas e horas (e pelo cafezinho noturno para que eu pudesse suportar o batidão de estudar nas madrugadas). Se eu cheguei até aqui hoje, é graças a base familiar e estrutura que vocês me proporcionaram em toda minha vida.

Ao meu companheiro de vida **Michail Athanase Spanopoulos** que surgiu em um momento inesperado no qual eu precisava de apoio, afeto e carinho. Você é um raio de sol numa manhã fria, a esperança que posso ser amada do jeitinho que sou, aceita, protegida, e principalmente cuidada. Obrigada por todo apoio e encorajamento nesse tempo de estudo, sou muito grata por ter sua companhia todos os dias. Amo você. A **Letícia** e **Miguel**, meus filhos do coração, que tornam minha vida mais leve, com brincadeiras, risadas e muito amor, sempre estarei aqui para o que precisarem.

À vovó **Francisca** e vovô **Manaces** que estão ao lado do papai, mas sempre me deram muito amor, apoio e incentivo nesses anos de estudo. Amarei vocês para sempre.

“Sentir, conviver, aprender, admirar e agradecer. Eis os desafios e virtudes de uma família”
Thiago pontes.

À Professora Doutora **Fabiana Brandão**, por ter sido o meu **portal dos sonhos**, por ter visto um futuro em mim, e ter me dado a chance de ser orientada por ela. Prof, eu não tenho nem palavras para descrever o quão sou grata por você ter confiado em mim, você realizou o sonho de uma família toda, viu capacidade em mim e o principal, **me forçou a crescer**. Todas as missões que você me orientou a executar me fizeram sair da minha zona de conforto, aprendi gestão, marketing, administração, otimização (de custos e tempo), tive liberdade de explorar o meu lado criativo e digital que tanto amo, sem que minhas asas fossem podadas. Obrigada por tudo, você me lançou da graduação para onde meus pés puderem ir, serei eternamente grata a todas as portas que você me abriu.

Aos amigos que me fortaleceram nessa caminhada, em especial minha parceira de laboratório **Carol**. Obrigada pelos ensinamentos, pela troca, parceria e toda ajuda nas minhas dificuldades, é um prazer dividir o espaço de trabalho com você, pois lhe admiro muito, como pessoa e profissional. Peço a Deus que retribua tudo que você fez por mim nesse tempo juntas, da graduação para a vida.

À Professora Doutora **Yanna Karla de Medeiros Nóbrega** por ter aberto as portas do LabMIC para que eu pudesse realizar esse sonho, por toda ajuda com materiais, equipamentos e por ter confiado esse espaço tão precioso em minhas mãos, por me acolher, por me olhar com ternura nos meus momentos de vulnerabilidade, principalmente no dia da minha defesa. Serei eternamente grata.

À Doutora **Rosane Mansan** por todos os conselhos, dicas e ensinamentos. Sua alegria de viver tornaram momentos difíceis muito mais fáceis de encarar. Obrigada Rô.

À Professora Doutora **Tanise Dalmolin** por sempre permitir assistir suas aulas de microbiologia e sempre estar disponível para me ajudar com dúvidas, com muita doçura, humildade e paciência. Professora, pensei que fosse brava, mas ao lhe conhecer percebi um ser humano incrível. Obrigada por tudo.

Ao Professor Doutor **Guilherme Gelfuso**, por me permitir ter um pouco mais de autoconfiança após sua avaliação tão cordial no trabalho de apresentação oral. Sua avaliação foi técnica e profissional, e ele nem sabe, mas eu recebi como um incentivo e encorajamento, e percebi que cheguei até aqui por merecimento.

Aos **Docentes** incríveis que contribuíram muito para essa formação, com aulas, trabalhos e debates, meus sinceros agradecimentos.

Aos avaliadores, por sua cordialidade e pontualidade nas contribuições para o trabalho.

À **Universidade de Brasília (UnB)** pela oportunidade de aperfeiçoamento e realização dessa etapa tão importante na minha vida.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF)** pela excelência, tenho muito orgulho de PERTENCER.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pelo incentivo financeiro que me permitiu dedicação exclusiva ao programa.

“Sorte é o que acontece quando a preparação encontra a oportunidade”

Elmer Letterman

*Não temas, porque eu sou contigo; não te
assombres, porque sou teu Deus; eu te
fortaleço, e te ajudo, e te sustento com a
destra da minha justiça.*

Isaías 41:10

RESUMO

COSTA, Adriane Torquati Madeira. **Relações desarmônicas entre micro-organismos: demonstrando o efeito de pós-bióticos de *Lactobacillus* sp. e Butirato de Sódio contra *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*.** Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2024.

Introdução: O aumento alarmante de micro-organismos resistentes a múltiplos medicamentos representa um dos desafios mais críticos para a saúde global, conforme indicam estatísticas da Organização Mundial da Saúde (OMS). Os antimicrobianos, pilares fundamentais no arsenal da quimioterapia médica, têm demonstrado eficácia notável desde o seu advento. Contudo, a emergência de resistência microbiana foi observada logo após a introdução de fármacos pioneiros, como a penicilina, um fenômeno impulsionado por mutações genéticas e pela seleção natural, que ameaça a efetividade de fármacos essenciais. Este desafio desencadeou a era de pesquisas focadas em entender e combater a resistência a antimicrobianos. Atualmente, o surgimento da pandemia de COVID-19 exacerbou o problema, levando ao aumento de doenças negligenciadas e de infecções secundárias, como as ocasionadas pelas bactérias *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*, particularmente pelo uso indiscriminado de antibióticos. No contexto geral, a resistência bacteriana é um desafio perene, que requer estudos e desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, capazes de mitigar o impacto da seleção natural sobre os fatores promotores de resistência microbiana. **Objetivo:** Assim, o presente estudo propôs avaliar o efeito de pós-bióticos secretados por *Lactobacillus* spp., e do ácido graxo de cadeia curta, butirato de sódio (NaBut), ambos presentes na microbiota intestinal, para controle de crescimento de *K. pneumoniae* e *S. aureus*. **Métodos:** Foram realizadas curvas de crescimento para as bactérias patogênicas, seguindo o protocolo de Concentração Inibitória Mínima (CIM), padronizados de acordo com o *Brazilian Antimicrobial Sensitivity Test Committee* (BrCAST) para ensaio de microdiluição em caldo. Os *Lactobacillus* spp. foram cultivados durante 48h a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ em meio de cultura MRS BROTH. As linhagens de *K. pneumoniae* e *S. aureus* foram cultivadas previamente em aerobiose durante 24h a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ em meio Mueller Hinton (MH) BROTH. No preparo do pós-biótico de *Lactobacillus* spp. foram empregadas culturas puras e frescas, centrifugadas e posteriormente filtradas com filtro de membrana estéreis. Os meios para os ensaios de CIM foram MH BROTH acrescidos dos pós-bióticos espécie-específica de *L. reuteri* e *L. rhamnosus*, e também foi preparado uma solução de estoque de NaBut a 500 mM. **Resultados:** Os dados deste estudo demonstram redução do crescimento de *K. pneumoniae* com pós-bióticos de *L. reuteri*, *L. rhamnosus* de 50% a 0,39%

e para NaBut com redução nas concentrações de 50 mM a 1,56 mM. Em *S. aureus* com pós-bióticos de *L. reuteri*, *L. rhamnosus* nas concentrações de 50% a 0,39% e para NaBut foi observado redução no crescimento de 50 mM a 3,1 mM. **Conclusão:** Tanto os pós-bióticos de *Lactobacillus* spp., quanto o NaBut foram capazes de reduzir o crescimento *in vitro* de *K. pneumoniae* e *S. aureus*. Os dados apontam para um coadjuvante terapêutico, com economicidade, reduzindo as chances de selecionar novos micro-organismos resistentes, por promover uma relação desarmônica em decorrência da competição.

Palavras-Chave: Pós-bióticos, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*.

ABSTRACT

COSTA, Adriane Torquati Madeira. **Disharmonious relationships between microorganisms: demonstrating the effect of postbiotics from *Lactobacillus* sp. and Sodium Butyrate against *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*.** Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2024.

Introduction: The alarming increase in microorganisms resistant to multiple drugs represents one of the most critical challenges for global health, as indicated by statistics from the World Health Organization (WHO). Antimicrobials, fundamental pillars in the arsenal of medical chemotherapy, have demonstrated remarkable effectiveness since their advent. However, the emergence of microbial resistance was observed shortly after the introduction of pioneering drugs, such as penicillin, a phenomenon driven by genetic mutations and natural selection, which threatens the effectiveness of these essential drugs. This challenge sparked an era of research focused on understanding and combating antimicrobial resistance. Currently, the emergence of the COVID-19 pandemic has exacerbated the problem, leading to an increase in neglected diseases and secondary infections, such as those caused by the bacteria *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*, particularly due to the indiscriminate use of antibiotics. In the general context, bacterial resistance is a perennial challenge, which requires studies and development of new therapeutic approaches, capable of mitigating the impact of natural selection on factors that promote microbial resistance. **Objective:** Thus, the present study proposed to evaluate the effect of postbiotics secreted by *Lactobacillus* spp., and the short-chain fatty acid, sodium butyrate (NaBut), both present in the intestinal microbiota, to control the growth of *K. pneumoniae* and *S. aureus*. **Methods:** Growth curves were performed for pathogenic bacteria, following the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) protocol, standardized according to the Brazilian Antimicrobial Sensitivity Test Committee (BrCAST) for broth microdilution assay. *Lactobacillus* spp. were cultivated for 48h at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ in MRS BROTH culture medium. The *K. pneumoniae* and *S. aureus* strains were previously cultivated aerobically for 24h at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ in Mueller Hinton (MH) BROTH medium. In the preparation of the postbiotic from *Lactobacillus* spp. pure and fresh cultures were used, centrifuged and subsequently filtered with a sterile membrane filter. The media for the MIC assays were MH BROTH plus species-specific postbiotics from *L. reuteri* and *L. rhamnosus*, and a stock solution of 500 mM NaBut was also prepared. **Results:** The data from this study demonstrate a reduction in the growth of *K. pneumoniae* with postbiotics from *L. reuteri*, *L. rhamnosus*

from 50% to 0.39% and for NaBut with a reduction in concentrations from 50 mM to 1.56 mM. In *S. aureus* with postbiotics from *L. reuteri*, *L. rhamnosus* at concentrations of 50% to 0.39% and for NaBut, a reduction in growth was observed from 50 mM to 3.1 mM. **Conclusion:** Both postbiotics from *Lactobacillus* spp. and NaBut were able to reduce the in vitro growth of *K. pneumoniae* and *S. aureus*. The data point to a cost-effective therapeutic aid, reducing the chances of selecting new resistant microorganisms, by promoting a disharmonious relationship as a result of competition.

Key words: Postbiotics, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Funções da cápsula de <i>K. pneumoniae</i>	27
Figura 2 - Mecanismos de evasão imunitária mediada por SpA	30
Figura 3 - Prebióticos, probióticos, simbióticos e pós-bióticos.....	35
Figura 4 - Mecanismos de ação dos pós-bióticos	38
Figura 5 - Esquema prático da metodologia	45
Figura 6 - Esquema da placa de 96 poços representando o planejamento do experimento com <i>Lactobacillus</i>	46
Figura 7- Esquema da placa de 96 poços representando o planejamento do experimento com NaBut.....	48
Figura 8 - Controle positivo de <i>K. pneumoniae</i> nos meios de cultivo Mueller Hinton e MRS combinados e separadamente	51
Figura 9 - Controle positivo de <i>S. aureus</i> nos meios de cultivo <i>Mueller Hinton</i> e MRS combinados e separadamente	52
Figura 10 - Efeito dose-dependente do pós-biótico de <i>L. reuteri</i> sobre o crescimento de <i>K. pneumoniae</i>	53
Figura 11 - Análise do Desvio-padrão representando a variação, entre as réplicas biológicas, do efeito dose-dependente do pós-biótico de <i>L. reuteri</i> sobre o crescimento de <i>K. pneumoniae</i>	54
Figura 12 - Efeito dose-dependente do pós-biótico de <i>L. rhamnosus</i> sobre o crescimento de <i>K. pneumoniae</i>	56
Figura 13 – Análise do Desvio-padrão representando o grau de variação, entre as réplicas biológicas, do efeito dose-dependente do pós-biótico de <i>L. rhamnosus</i> sobre o crescimento de <i>K. pneumoniae</i>	57
Figura 14 - Efeito dose-dependente de NaBut sobre o crescimento de <i>K. pneumoniae</i>	59
Figura 15 –Análise do Desvio-padrão representando o grau de variação do efeito dose-dependente NaBut sobre o crescimento de <i>K. pneumoniae</i>	60
Figura 16 - Efeito dose-dependente do pós-biótico de <i>L. reuteri</i> sobre o crescimento de <i>S. aureus</i>	61
Figura 17- Análise do Desvio-padrão representando o grau de variação do efeito dose-dependente do pós-biótico de <i>L. reuteri</i> sobre o crescimento de <i>S. aureus</i>	62
Figura 18 - Efeito dose-dependente do pós-biótico de <i>L. rhamnosus</i> sobre o crescimento de <i>S. aureus</i>	63

Figura 19 - Análise do Desvio-padrão representando o grau de variação do efeito dose-dependente do pós-biótico	64
Figura 20 - Efeito dose-dependente de NaBut sobre o crescimento de <i>S. aureus</i>	66
Figura 21– Análise do Desvio-padrão representando o grau de variação do efeito dose-dependente NaBut sobre o crescimento de <i>S. aureus</i>	67
Figura 22 - Síntese da hipótese de Relações desarmônicas entre micro-organismos.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Representação dos testes com pós-bióticos de *L. reuteri* e *L. rhamnosus*.....47

Tabela 2 - Representação dos testes com butirato de sódio49

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
AGCC	Ácido Graxo de Cadeia Curta
ATCC	<i>American Type Culture Colletion</i>
BRCast	<i>Brazilian Antimicrobial Sensitivity Test Committee</i>
CFS	Sobrenadante Livre de Células
CIM	Concentração Inibitória Mínima
DA	Dermatite Atópica
DC	Célula Dendrítica
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ECN	Enterocolite Necrosante
ECDC	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i> ou Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças
HDACi	Histonas Desacetilases
IL	Interleucina
ISAPP	<i>International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics</i> ou Associação Científica Internacional de Probióticos e Prebióticos
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
LACEN-DF	Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal
OD	Densidade Óptica
OMS	Organização Mundial da Saúde
MDR	Bactérias Multirresistentes
MMP-9	Matriz de Metaloproteinase-9
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina
NaCl	Cloreto de Sódio
NaBut	Butirato de Sódio
pH	Potencial Hidrogeniônico
PMN	Polimorfonuclear
RPM	Rotações Por Minuto
SpA	<i>Staphylococcal Protein A</i>

SNC	Sistema Nervoso Central
Th	Linfócitos T <i>helper</i>
Treg	Linfócitos T reguladores
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
ZO-1	Zona Ocludens-1 ou Zonulina

Sumário

1. Introdução.....	20
2. Objetivos	25
2.1. Objetivo Geral.....	25
2.2. Objetivos específicos	25
3. Revisão da Literatura	26
3.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	26
3.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	28
3.3. A microbiota intestinal.....	31
3.4. Prebióticos & Probióticos - uma “espada” e um escudo contra infecções	33
3.5. Pós-bióticos: uma nova perspectiva no combate as infecções.....	36
3.5.1. Efeitos imunomoduladores mediados por Pós-bióticos.....	37
3.5.2. Efeitos antitumorais dos Pós-bióticos.....	37
3.6. Butirato de sódio como potencializador das atividades antimicrobianas	38
3.6.1. Atividade antitumoral do NaBut.....	38
3.6.2. O papel do NaBut na inflamação	39
3.7. Antimicrobianos e Resistência.....	39
3.7.1. Antibióticos.....	39
3. 7. 2. Resistência	40
4. Materiais e Métodos	42
4.1. Origem e isolamento das linhagens	42
4.2. Estoque e manutenção de inóculos	42
4.3. Meios de cultivo.....	43
4.4. Reagentes e soluções.....	43
4.5. Ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	44
4.6. Preparo da Placa - Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	44
4.6.1. Preparo de pós-biótico de <i>L. reuteri</i> e <i>L. rhamnosus</i>	44

4.6.2. Semeio de <i>K. pneumoniae</i> e <i>S. aureus</i>	45
4.6.3. Ajuste de <i>K. pneumoniae</i> e <i>S. aureus</i> na escala McFarland.	45
4.6.4. Execução da placa <i>Lactobacillus</i>	46
4.6.4.1. Volumes da placa <i>Lactobacillus</i>	46
4.6.5. Execução das Placas de NaBut	47
4.6.5.1 Volume da placa de NaBut	48
4.7. Leitura das placas por espectrofotometria	49
4.8. Análise Estatística.....	49
5. Resultados e Discussão	51
5.1. Análise de crescimento no meio MRS – estabelecendo controles.....	51
5.2. Testes CIM para <i>K. Pneumoniae</i> – pós-biótico de <i>L.reuteri</i>	52
5.3. Testes CIM para <i>K. Pneumoniae</i> – pós-biótico de <i>L. rhamnosus</i>	55
5.4. Testes CIM para <i>K. pneumoniae</i> – pós-biótico NaBut	58
5.5. Testes CIM para <i>S. aureus</i> – pós-biótico de <i>L.reuteri</i>	60
5.7. Testes CIM para <i>S. aureus</i> – pós-biótico de NaBut.....	65
6. Conclusão	68
7. Referências	70

1. Introdução

A Medicina experimentou uma significativa transformação mediante a introdução dos antimicrobianos, representando um notável avanço no campo biotecnológico. Esta inovação permitiu a salvação de inúmeras vidas ao abordar infecções previamente consideradas potencialmente fatais, concomitantemente promovendo melhorias substanciais na qualidade de vida de milhões de indivíduos afetados por tais enfermidades. O tratamento farmacológico, uma vez iniciado, manifesta-se eficaz na atenuação dos sintomas em curto prazo, contrapondo-se aos efeitos prejudiciais dos patógenos (WANG et al., 2020).

Contudo, como o uso crescente de antimicrobianos se tornou indiscriminado, resultando em aceleração de processos de seleção natural que geram resistência aos medicamentos, a resistência bacteriana tem se tornado uma ameaça à eficácia destes fármacos, através da capacidade de tais micro-organismos driblarem o ambiente proposto a ser microbicida, e sobreviverem às concentrações dos fármacos que são potencialmente eficientes contra organismos de uma mesma espécie (ALÓS, 2015).

A resistência aos antibióticos pode ser definida como um mecanismo de adaptação dos micro-organismos, que devido a mutações nos genes ou obtenção de genes de resistência que conseguem sobreviver a presença do fármaco. Esses fenômenos podem ocorrer devido a diversas alterações no sítio de ação do fármaco ou uma consequente inativação ou obliteração decorrente a aquisição de genes de resistência. Enquanto processo de elaboração de um novo fármaco é demorado decorrente a sua complexidade, o mecanismo de resistência é demasiadamente acelerado, carecendo assim que novas investigações com foco ao combate a resistência se tornem prioridade diante do cenário alarmante (CUSSOLIM et al., 2021).

As infecções multirresistentes são consideradas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) um grave problema de saúde pública mundial, tornando-se prioridade dado ao alarmante crescimento no número de casos clínicos e maior frequência na ineficiência dos fármacos. De acordo com esta projeção, a OMS prevê uma crescente e exacerbada resistência bacteriana a curto prazo. Anualmente as infecções resistentes a medicamentos já causam pelo menos 700.000 mortes, incluindo 230.000 mortes por tuberculose multirresistente (IACG, 2019). Em um cenário mais ameaçador, se nenhuma ação for tomada, estima-se cerca de 10 milhões de mortes anuais até 2050, sendo que 2,4 milhões de pessoas poderão vir a óbito em países de alta renda entre 2015 e 2050 (ref?).

Um dos principais fatores, se não o principal, responsável por este cenário alarmante da OMS, é a prática do uso empírico de antibióticos, sem embasamento em evidências científicas. A OMS relata que a resistência aos antimicrobianos pode ser considerado como uma das 10 maiores preocupações e ameaças a saúde em amplitude global (ARTUS, 2019).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) relatou que em vista da crescente porcentagem de resistência aos antimicrobianos, pode-se observar em sua extensão danos à saúde populacional, em que tais infecções são notórias e ameaçam o quadro do paciente, seja ele imunodeprimido, ou esteja momentaneamente exposto por algum procedimento realizado em ambiente hospitalar, onde essas bactérias oportunistas se instalam e contaminam o ambiente, posteriormente infectando o indivíduo. Os danos incluem aumento do risco de evolução para óbito, invalidez, maior necessidade de atenção da equipe médica, levando ao uso imprescindível de antibióticos alternativos e de custo mais elevado (ANVISA, 2022; YUKI MURAI et al., 2022).

A pandemia da COVID-19 foi um importante coadjuvante que favoreceu o aumento da resistência aos antibióticos. A propagação de *fake news* por meio da internet foi um dos principais fatores para estimular o uso de diversos fármacos pela população, incluindo antibióticos sem nenhuma comprovação científica. Um estudo realizado no Distrito Federal, com foco em resistência antimicrobiana, na faixa etária de maiores que 70 anos, demonstrou que 50% dos entrevistados apresentaram má orientação e relaram mau uso dos antibióticos. Destes, 15% relataram já terem sido acometidos por micro-organismos resistentes e 9,1% afirmam terem utilizado antibióticos para tratar o vírus responsável por causar a COVID-19 (GALVÃO et al., 2023).

Neste contexto, a crescente propagação de *Klebsiella pneumoniae* multirresistente (MDR) é uma intimidadora ameaça à saúde mundial, por causar além de danos nocivos à saúde do hospedeiro, e promover complicações pelo uso de antibióticos como as polimixinas, que são neurotóxicas, nefrotóxicas e ototóxicas (ABDELHALIM et al., 2022).

Em meados da década de 1960 disseminou-se a variante *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), que a partir daí se tornou uma das principais bactérias de interesse médico, por se tratar de uma das causas de infecções hospitalares de maior preocupação. Os países de maior prevalência estão localizados na América, com ênfase no Brasil, que está entre os países com maior número de casos. O diagnóstico microbiológico pode variar de acordo com a necessidade de cada indivíduo, assim podem ser encontrados em amostra de secreção purulenta, tecidos ou sangue, quando há suspeita de infecção ou *swabs* nasais e de garganta em indivíduos assintomáticos. A partir do diagnóstico é possível traçar

qual alternativa melhor se aplica a descolonização do MRSA em cada quadro clínico e momento da infecção (LEE et al., 2018).

No fluxo inverso do conhecimento patogênico sobre alguns micro-organismos, a utilização de micróbios com capacidade antimicrobiana empregados na prevenção de doenças vêm sendo aplicada desde as civilizações mais antigas, quando foi possível observar a eficácia de emplastos feitos de pão mofado, para auxiliar na cicatrização de feridas na antiga Sérvia, Egito, Grécia e China. Esse método impedia a complicação dos quadros dos feridos e uma possível infecção bacteriana grave (ANJOS; GÓES, 2023; NUNES, 2023).

Por outro lado, os micro-organismos são os seres vivos mais antigos do planeta e vivem em relações ecológicas com os animais desde seu surgimento. Por exemplo, o trato gastrointestinal é colonizado por uma multiplicidade de micro-organismos que são cruciais para a manutenção da vida, que auxiliam no sistema imunitário e previnem a instalação de patógenos oportunistas, como o fungo *Candida albicans*, parte natural da microbiota saudável, mas que se apresenta como patógeno, em situações de imunodeficiência do hospedeiro, podendo causar um estágio infeccioso conhecido popularmente como candidíase, e até alcançar o sistema sanguíneo, ocasionando infecções mais graves como Candidemia ou Candidíase hematogênica (OLIVEIRA; CAVALCANTE; RIBEIRO, 2021).

Um novo conceito de micro-organismos que sugerem benefícios ao organismo é elucidado a cada nova pesquisa com a temática de utilizar o que já está disponível na microbiota de cada sítio anatômico, portanto, a comunidade científica tem proposto um aprofundamento técnico-conceitual que descreva detalhadamente os componentes dos prébióticos, probióticos e mais recentemente, pós-bióticos. Os probióticos são importantes para a homeostase deste sistema, entretanto, o seu papel determinante se dá pelo estímulo à resposta imunitária que possibilita seu uso na prevenção e tratamento de diversas patologias, o que sugere para os pesquisadores uma possibilidade de investigar tais benefícios e utilizar para buscar novas medidas em combate a essas infecções (LARANJEIRA, 2020).

No cenário atual do século 21, os cientistas e a população como um todo tem considerado os benefícios dos alimentos funcionais, aqueles capazes de produzir metabólitos responsáveis por promover saúde e auxiliar na nutrição de uma forma incomum, estão associados a reforçar a saúde por meio da alimentação e não promover a cura de doenças (OLIVEIRA et al., 2002).

Inicialmente, os probióticos e prebióticos eram mencionados apenas quando se tratava de microbiota intestinal. Atualmente, com os estudos avançados a respeito de seus benefícios, e com seu potencial de mercado empregado para consumo sem necessariamente estar ligado a

uma patologia e sim a manutenção e promoção de uma microbiota saudável, pode-se afirmar que sua atividade não está obrigatoriamente agregada a bactérias viáveis. Destarte, as pesquisas concluem que a eficácia dos probióticos podem estar ligadas a células, metabólitos, lisados celulares e que esses produtos são então, classificados como pós-bióticos de acordo com o *International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics* (ISAPP). Diversos ensaios podem induzir a produção dos pós-bióticos, e em seguida os benefícios do sobrenadante podem ser investigados, e seus componentes isolados e analisados separadamente ou em conjunto, promovendo o início de novos estudos (LIANG; XING, 2023).

Na natureza existem relações ecológicas entre os seres vivos denominadas harmônicas e desarmônicas. A competição por nutrientes e território é a premissa postulada por Herbert Spencer e mais tarde explorada por Charles Darwin: sobrevivência do mais apto, ou conceito relativo à competição pela predominância (DARWIN, 2001).

Tal competição ocorre em todos os nichos ecológicos, seja em um macroecossistema (oceanos e florestas, por exemplo) ou microecossistema (microbiota da pele, intestino, por exemplo) (WAGNER; JOHNSON, 2012). Para um organismo ter completa harmonia, se faz necessário que haja equilíbrio entre os micro-organismos benéficos, de defesa, oportunistas e patógenos. Assim, em perfeito equilíbrio se estabelece uma homeostase. Seguindo este racional e somando aos esforços para atender ao apelo da OMS, pesquisadores em todo mundo vem estudando eventos relacionados a biologia dos micro-organismos patogênicos e suas interações parasito-hospedeiro, o que desde os primórdios da descoberta da penicilina conduz às novas abordagens terapêuticas (PETROVA et al., 2015).

A interação *inter* e *intra* espécies pode revelar formas de lidar com a resistência do micro-organismo, modular positivamente efeitos benéficos no hospedeiro diminuindo a colonização por patogênicos resistentes (PANIÁGUA et al., 2021).

O butirato de sódio (NaBut) é um Ácido Graxo de Cadeia Curta (AGCC) produto da fermentação de bactérias probióticas presentes no cólon, a partir de fibras alimentares não digeridas (FURUSAWA et al., 2013). O butirato apresenta propriedades anti-inflamatórias e anticancerígenas, além de seu papel como modulador epigenético em fungos patogênicos (BRANDÃO et al., 2015).

A literatura descreve o NaBut como pós-biótico, por ser um subproduto gerado a partir de probióticos e por ter influências benéficas no organismo (HUANG, 2021). Entretanto, há autores que descrevem o Nabut como prebiótico, que atenua a barreira do epitélio intestinal e combate patógenos oportunistas (BEISNER et al., 2021).

Dessa forma, este projeto propôs avaliar os benefícios das relações entre produtos de *Lactobacillus* e micro-organismos resistentes, com a finalidade de observar a atividade antimicrobiana e/ou microbiostática do pós-biótico de *Lactobacillus* e do butirato de sódio (NaBut), investigando um potencial terapêutico contra *K. pneumoniae* e *S. aureus*, que estão atualmente entre as bactérias resistentes de maior interesse clínico.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito de produtos secretados por *Lactobacillus* spp. e do ácido graxo de cadeia curta butirato de sódio, presentes na microbiota intestinal, sobre crescimento de *K. pneumoniae* e *S. aureus*.

2.2. Objetivos específicos

Avaliar o efeito dos pós-bióticos de *Lactobacillus* spp. sobre crescimento de *K. pneumoniae*.

Avaliar o efeito dos pós-bióticos de *Lactobacillus* spp. sobre crescimento *S. aureus*.

Investigar efeito do ácido graxo butirato de sódio (NaBut) sobre crescimento de *K. pneumoniae*.

Investigar efeito do ácido graxo NaBut sobre crescimento de *S. aureus*.

Determinar a Concentração Mínima Inibitória (CIM) dos pós-bióticos de *Lactobacillus* spp. sobre o crescimento de *K. pneumoniae* e *S. aureus*.

Determinar o CIM de NaBut sobre o crescimento de *K. pneumoniae* e *S. aureus*.

3. Revisão da Literatura

3.1. *Klebsiella pneumoniae*

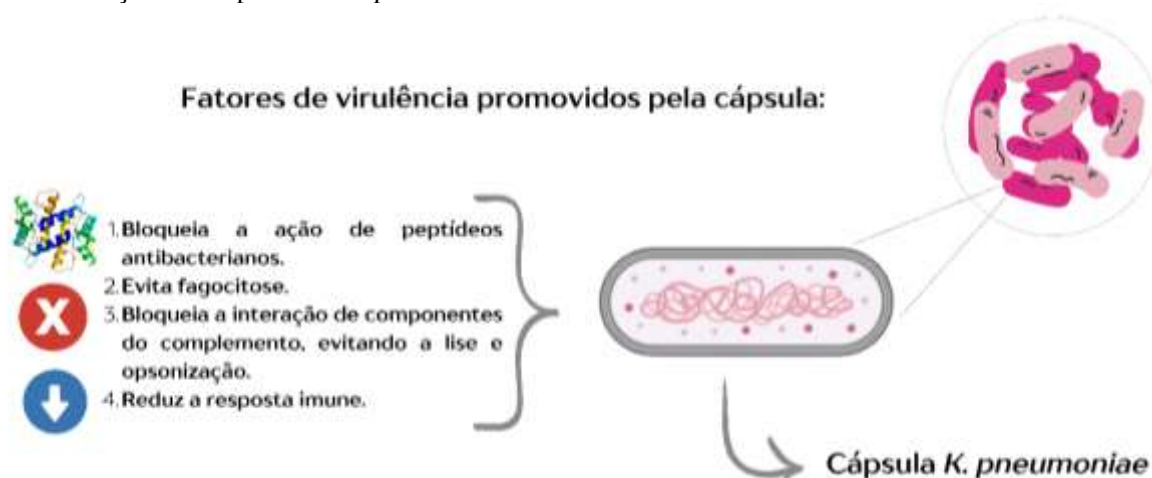
K. pneumoniae é uma bactéria Gram-negativa oportunista, anaeróbia facultativa, geralmente encontrada em ambiente hospitalar (WYRES; LAM; HOLT, 2020). A infecção por esse patógeno pode acometer o trato urinário, respiratório e o sistema hematopoiético e causar abscessos, meningite, infecção urinária, pneumonia e sepse. Quando adquiridas em ambiente hospitalar, as infecções geralmente estão associadas aos cateteres, que são porta de entrada para que o micro-organismo consiga acessar a corrente sanguínea que possui conexão com todos os sistemas (CLEGG; MURPHY, 2016).

A partir do surgimento dos antibióticos, *K. pneumoniae* tornou-se uma das bactérias de interesse hospitalar com maior frequência de infecções, sendo comumente encontrada em pacientes imunocomprometidos. Esse patógeno possui prevalência em diversos países, ressaltando ainda mais a necessidade de terapias eficazes para sua descolonização. Em Singapura as taxas de mortalidade chegam a 26%, notavelmente elevadas, e a prevalência dessa variante multirresistente sinaliza a rápida disseminação geográfica no país (WANG et al., 2020).

A infecção por *K. pneumoniae* pode acometer todas as faixas etárias, no entanto, recém-nascidos, idosos e imunocomprometidos estão no grupo de risco (HIGHSMITH; JARVIS, 1985). A *K. pneumoniae* produtora de Carbapenemase (KPC), é uma das maiores preocupações no ambiente hospitalar, devido a multiplicidade de antibióticos aos quais possui resistência. No Brasil, os primeiros casos de KPC ocorreram em 2006, em pacientes internados em uma Unidade de Terapia Intensiva (UTI), a partir daí a variante passou a ser frequentemente isolada em ambiente hospitalar (FRANCHINI; CÓSER, 2016).

A cápsula de *K. pneumoniae* é um de seus principais fatores de virulência, suas funções foram delineadas com a finalidade de entender a interação patógeno-hospedeiro (PACZOSA; MECSAS, 2016). A cápsula é capaz de fornecer ao patógeno: proteção contra as respostas imunológicas do hospedeiro, evitando que ocorra fagocitose, opsonização, reconhecimento dos peptídeos antimicrobianos como a lactoferrina, bloqueio da ação do sistema complemento evitando interações de C3 com a membrana, e bloqueio na ativação dos anticorpos específicos. Entretanto, a preservação da bactéria através da cápsula tende a ser defensiva e não ofensiva (ZHU et al., 2021).

Figura 1- Funções da cápsula de *K. pneumoniae*



Fonte: Elaboração própria

Segundo dados da ANVISA, em 2019 *K. pneumoniae* destaca-se como a segunda bactéria com maior percentual de resistência microbiana, 48,66% do total de casos, e o micro-organismo com a maior quantidade de isolados do Brasil com 3125, e também do Distrito Federal com 87 casos. Em 2022, *K. pneumoniae* obteve a maior quantidade de isolados de UTI adulto do Brasil com 5504 casos e 54,92 % de percentual de resistência (ANVISA, 2022). Esses dados demonstram que o percentual de resistência apesar de oscilar, não apresenta redução significativa para *S. aureus* e apresentou aumento para *K. pneumoniae*, deixando em aberto a necessidade de aprofundar as investigações acerca deste micro-organismo.

Conforme as investigações, foram evidenciados 68,11% de resistência antimicrobiana a cefalosporina de terceira e quarta geração, e 51,78% a carbapenêmicos (ANVISA, 2019). Apesar do antibiótico Tigeciclina ter sido desenvolvido com um alto teor de eficácia e ação de amplo espectro (WANG et al., 2020), no qual maioritariamente os isolados de *K. pneumoniae* são sensíveis, observou-se anteriormente uma diminuição na susceptibilidade em que a concentração inibitória mínima (CIM) em alguns isolados era superior a 1 µg/mL. Foi observado que uma série de mutações espontâneas resultou nessa perda de sensibilidade e, consequentemente, no aumento da resistência deixando em aberto a necessidade de aprofundar as investigações acerca deste micro-organismo (JONES et al., 2009).

Há evidências de que além de infectar os humanos e demonstrar um perfil de resistência, *K. pneumoniae* também pode infectar animais domésticos, sendo frequentemente encontrada é considerada uma das espécies mais prevalentes e isoladas nesse grupo de animais. Apesar de sua importância, há carência de estudos nessa temática. Após ser isolada em alimentos, *K. pneumoniae* demonstrou não se limitar apenas ao ambiente hospitalar. Um estudo realizado na

China, investigou a presença da bactéria em alimentos comercializados no varejo, disponibilizados para a população, onde foi possível analisar que a presença do patógeno com perfil de resistência bem definido como *K. pneumoniae*, evidencia uma ameaça à saúde da população e reforça a necessidade de rastreio da bactéria em alimentos (ZHANG et al., 2018; ARAÚJO et al., 2023).

3.2. *Staphylococcus aureus*

S. aureus é uma bactéria Gram-positiva que pode fazer parte da microbiota da pele de humanos. Entretanto, em determinadas situações essa bactéria pode transitar de micro-organismo comensal para patógeno, desencadeando infecções das mais simples como espinhas e furúnculos às mais graves como meningite (IRAZOQUI et al., 2010)

Por se inserir em diferentes cenários, *S. aureus* é um micro-organismos com excelente potencialidade investigativa, logo um bom candidato aos estudos clínicos, visto que, pode ser comensal, colonizadora assintomática ou sintomática, oculta ou patológica, a depender da susceptibilidade do hospedeiro e da interação do organismo com a bactéria. Todo invasor desperta uma resposta imunológica. Com *S. aureus*, devido a variedade de fatores de virulência, tal reação protetora do organismo é prejudicada e reduzida, por essa razão, o organismo se torna vulnerável a infecções recorrentes com curtos ou longos intervalos (HOWDEN et al., 2023).

Geralmente, as infecções causadas por *S. aureus* iniciam a partir de uma colonização assintomática, onde a bactéria se aloja no corpo, multiplica-se e posteriormente inicia a fase sintomática. Comumente, o patógeno é adquirido em ambiente hospitalar, onde a contaminação pode ocorrer por contato com objetos contaminados, ou colonizar o corpo de forma temporária ou permanente, em vias externas até que haja uma oportunidade de infectar o organismo. As cavidades nasais são convencionalmente o local onde *S. aureus* se aloja, porém também pode ser encontrada na pele e até mesmo na mucosa intestinal. Um estudo feito em um grupo de 30 pacientes, observou que a colonização permanente ocorre em 10% do total dessa população (ACTON et al., 2009; CHEUNG; BAE; OTTO, 2021).

Uma das primeiras bactérias contidas por antibióticos foi *S. aureus*, a partir do marco histórico da descoberta da penicilina, entretanto após sua habilidade de se adaptar, mutar e resistir, tornou-se uma das espécies bacterianas de maior interesse clínico e tema para diversos

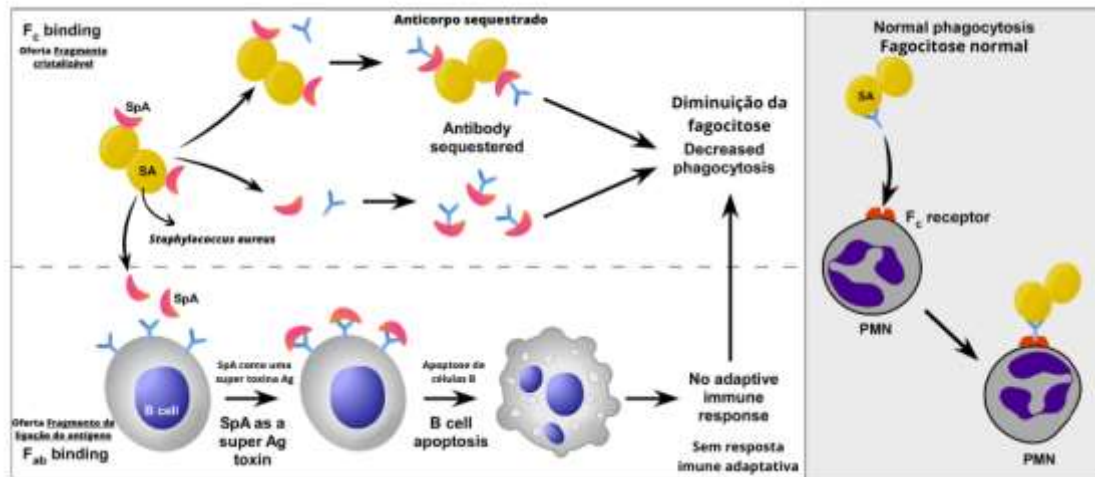
estudos com foco no combate de sua disseminação, visto que, o gênero *Staphylococcus* possui mais de 33 espécies, dentre elas 17 podem acometer humanos (SANTOS et al., 2007).

As cepas de *S. aureus* não são consideradas fastidiosas, uma vez que, são capazes de se desenvolver em diversificados meios de cultura em caldo ou ágar, com pH = 7 em temperaturas próximas à 37°C. Após se expor a essas condições climáticas, em aproximadamente 18 horas é possível observar suas colônias, que se apresentam com coloração amarelo-dourado/amarelo-ouro ou acinzentado. Um relevante meio de cultura para *S. aureus* é o manitol-sal, devido a capacidade de *aureus* fermentar o manitol, e com isso produzir ácido lático, já no ágar sangue apresenta-se frequentemente com um halo de β - hemólise em torno das colônias. Outra forma de identificação é na presença de 7,5% de cloreto de sódio (NaCl), que induz a produção de coagulase, onde confirma sua espécie devido à presença da enzima (SANTOS et al., 2007).

Diferentes estudos se dedicam a compreender o comportamento de *Staphylococcus aureus* MRSA, pois suas variantes evolutivas necessitam de atenção primária devido a não existência de tratamento alternativo em combate a essa variante bacteriana. Já em meados de 1961, observou-se que *S. aureus* apresentou resistência ao antibiótico de escolha para tratamento de infecções ocasionados por essa bactéria, a meticilina (MRSA - no Brasil: oxacilina ORSA); tal fato ocorreu logo após adquirir de resistência à penicilina (ENRIGHT et al., 2002).

A escolha de qual antibiótico será utilizado varia de acordo com os testes de susceptibilidade realizados anteriormente no início do tratamento, tal recomendação, se dá, pela quantidade de fármacos nos quais as espécies estafilocócicas adquiriram resistência. Um dos principais fatores de virulência da *S. aureus* é a presença da proteína A (SpA: *Staphylococcal protein A*), a SpA é uma proteína de superfície capaz de realizar ligações covalentes com o peptídeoglicano na parede celular bacteriana. Quando o *S. aureus* está sendo cultivado *in vitro* a SpA é liberada no meio. A SpA possui uma camada única polipeptídica com quatro resíduos de tirosina expressos em sua superfície, que especificam sua atividade principal como fator de virulência. Um dos mecanismos descritos ocorre pela capacidade da proteína realizar o sequestro dos anticorpos, inativando seu sítio de ligação e impossibilitando estes anticorpos de se comuniquem com as células fagocitárias, consequentemente diminuindo a resposta imune (CUSSOLIM et al., 2021).

Figura 2 - Mecanismos de evasão imunitária mediada por SpA



Legenda: No painel superior esquerdo ocorre a demonstração de duas vias do SpA (formato de lua vermelha) presente na superfície de *S. aureus* (SA), o SpA que é secretado livremente e liga-se à região Fc do anticorpo (Ab), evitando assim a fagocitose normal (painel inferior direito), ou permanece na superfície do *S. aureus* e também liga-se à região Fc do anticorpo. Alternativamente, SpA liga-se às regiões Fab do receptor de células B (painel inferior esquerdo), que induz a morte de células B e impede a produção de anticorpos específicos para *S. aureus* consequentemente diminuindo a fagocitose. Ag (antígeno); PMN (leucócito polimorfonuclear) (KOBAYASHI; DELEO, 2013).

Fonte: Adaptado de KOBAYASHI; DELEO, 2013

Devido à habilidade de expressar um conjunto bem-adaptado de fatores de virulência, que garantem sucesso das infecções em hospedeiros susceptíveis (SANTOS, et al., 2007), bem como a aquisição de genes de resistência aos antibióticos de uso padrão, *S. aureus* se tornou um dos maiores problemas de saúde pública, necessitando de monitoramento e protocolos de eliminação e controle de disseminação nos casos de MRSA (ARTUS, 2019).

MRSA assumiu um importante papel nas pesquisas em todo mundo. Dado que, a frequência que causa infecções em ambiente hospitalar, vem aumentando aceleradamente. Em casos comuns é possível constatar a presença de MRSA em bacteremias, infecções no sistema respiratório, inflamações ósseas e até osteomielite caso evolua para um quadro clínico grave (CHALMERS; WYLAM, 2020).

Existe uma limitação aos tratamentos que concernem MRSA, entretanto, essa vertente da pesquisa vem recebendo mais atenção dos pesquisadores em diversas partes do mundo, empenhados em desenvolver um novo antibiótico capaz de combater 100% esse micro-organismo ou auxiliar na descolonização em grande escala. O entendimento completo dos mecanismos de MRSA, suas vias de contaminação, infecção e contágio, além da investigação dos fatores de virulência até o detalhamento dos fatores de risco, são importantes variantes na busca incessante por um fármaco eficaz, assim como a elucidação de novas alternativas, como

as vacinas, que podem se tornar uma medida profilática e de controle de casos (LEE et al., 2018).

Um estudo realizado no Brasil visando isolar *Salmonella* spp, *Escherichia coli* e *S. aureus* em carnes bovinas, detectou a presença de *S. aureus* em 25, 35% das amostras, com o perfil de resistência delineado, demonstrando resistência à penicilina, tetraciclina e clorafenicol com 62,5%, 18,75% e 6,25% respectivamente (BIER et al., 2022). Em um estudo seguindo a mesma temática, NAAS et al., detectaram a presença de *S. aureus* em 35, 5% das amostras de carne bovina selecionadas para o estudo. Esses dados atestam a imprescindibilidade de elucidar novas abordagens terapêuticas para auxiliar na descolonização de *S. aureus*, e o carecimento de pesquisas focadas na indústria alimentar (NAAS et al., 2019).

De acordo com os dados epidemiológicos mais recentes disponíveis no Brasil, em 2019 *S. aureus* ocupou a 3ª posição em número de isolados resistentes em pacientes. Houve 2449 casos de infecções em adultos, dos quais 59,1% foram resistentes à oxacilina e 3,9% resistentes à vancomicina (ANVISA, 2019). Em relação ao Distrito Federal, mais de 19% dos isolados clínicos são resistentes à oxacilina. Os dados são preocupantes e acendem um alerta acerca do uso indiscriminado de antibióticos, que aceleram e promovem seleção de linhagens resistentes. Seguindo este racional, há uma região cinzenta na medicina no tocante à discussão sobre descolonizar ou não pacientes assintomáticos portadores de MRSA, por essas alternativas disponíveis, na atualidade, poderem acarretar mais pressão seletiva no surgimento de linhagens resistentes (NOGUEIRA et al., 2023).

3.3. A microbiota intestinal

A microbiota intestinal é uma das principais do corpo humano, composta em sua maioria por uma multiplicidade de bactérias anaeróbias, sendo comumente encontrado: *Bacteroides* spp., *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp., *Eubacterium* spp., *Fusobacterium* spp., *Peptostreptococcus* spp., e *Ruminococcus*. Ela possui capacidade de manter milhões de micro-organismos vivos convivendo em perfeita harmonia. Esse fenômeno de homeostase, ocorre devido a uma adaptação do organismo ao reconhecer o que é patogênico e viabilizar a resposta imune imediata, por esse fator é possível afirmar que o intestino é um microsistema independente de outras partes do corpo. A maior diversidade bacteriana está localizada no intestino, devido a isso, reitera-se que qualquer desequilíbrio local, pode ocasionar impactos em todo o organismo (FAN et al., 2019).

Há evidências de que existe uma associação característica entre as atividades cerebrais e o intestino, e que ambas se comunicam e influenciam uma à outra. O sistema nervoso central (SNC) assume um desempenho fundamental para a manutenção da vida, qualquer falha ou desequilíbrio razoavelmente considerável, pode comprometer todo o funcionamento do organismo. A depender da desarmonia nas atividades intestinais, as mesmas podem impactar diretamente no funcionamento do SNC. As interações entre a microbiota intestinal e o SNC é pauta para diversos estudos, que visam elucidar detalhadamente as vias metabólicas de conexão entre os dois sistemas (NAUFEL et al., 2023).

O mecanismo que favorece essa comunicação é chamado eixo-cérebro-intestino-microbiota, a microbiota intestinal é sensível a diversos fatores alguns deles são: temperatura, qualidade de sono, faixa etária, variações climáticas, uso de medicamentos e estresse. Esses fatores, exceto a idade, quando estão em condição de desequilíbrio para com a saúde da microbiota, são capazes de gerar doenças físicas ou desencadear distúrbios psicológicos. Investigar estratégias de fortalecimento da microbiota intestinal se faz cada vez mais necessário (NAUFEL et al., 2023).

Diversos processos fisiológicos e patológicos dependem de uma microbiota saudável. Em pessoas saudáveis, sem doenças ou limitações fisiológicas, esse processo de manutenção das microbiotas do corpo ocorre de forma natural, uma vez que o sistema imunitário realiza essa função. Em pessoas imunodeprimidas e/ou em condição patológica esse mecanismo não ocorre sem auxílio de fármacos e suplementações. Inúmeras vezes, os mecanismos de defesa do organismo humano são mediados por antibióticos, que são capazes de combater doenças infecciosas, que são atualmente as mais frequentes em ambiente hospitalar, onde se encontram pessoas com vulnerabilidade imunológica (BECATTINI; TAUR; PAMER, 2016).

Embora existam processos patológicos que a microbiota pode causar devido a sua perda de homeostase, há funções benéficas que a mesma possui, tão fundamentais para o corpo humano que já foi considerada um órgão adjunto (O'HARA; SHANAHAN, 2006). As bactérias comensais presentes na microbiota intestinal são capazes de produzir vitaminas B e K, e de fermentar alguns compostos alimentares resultando nos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Constata-se que a microbiota não se limita a funções apenas no intestino, possuindo capacidade de influenciar no equilíbrio de diversos órgãos e sistemas (BECATTINI; TAUR; PAMER, 2016).

Um dos responsáveis pelo desequilíbrio da microbiota intestinal é o uso de antibióticos, devido a capacidade de destruir não só o patógeno alvo, mas também a porção de bactérias

benéficas que auxiliam no equilíbrio e manutenção sistemática (MIMS et al., 2005; TORTORA et al., 2005; BRANDT et al., 2006; MURRAY et al., 2006; MANZONI et al., 2008).

O desequilíbrio intestinal é classificado como disbiose, este fenômeno pode ocorrer após a alteração da microbiota em decorrência do uso de antibióticos a longo prazo, de maneira inadequada e a depender do quadro imunitário de cada indivíduo. Compreende-se a partir daí, a necessidade de elucidar novos mecanismos de defesa na microbiota intestinal, que consiga reestabelecer o equilíbrio. Os probióticos, devido aos seus inúmeros benefícios comprovados, são produtos que possuem potencial abordagem terapêutica não-medicamentosa ou complementar aos fármacos (DOS SANTOS; VARAVALLLO, 2011).

3.4. Prebióticos & Probióticos - uma “espada” e um escudo contra infecções

A OMS define os *Lactobacillus* como um grupo de bactérias Gram-positivas, aeróbicas ou anaeróbicas facultativas, bacilares ou coccoides, que estão naturalmente no trato gastrointestinal de humanos e outros animais. São frequentemente usadas como probióticos, que são micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, induzem benefícios à saúde do hospedeiro (HILL et al., 2014).

Por definição, prebióticos são carboidratos não digeridos, fermentados pela microbiota intestinal, que realizam produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) como butirato, acetato e propionato, substâncias benéficas para o organismo por auxiliarem na seleção de populações de micro-organismos que compõem a microbiota saudável. A atividade metabólica *inter* e *intra* reinos/classes, contribui indiretamente no desenvolvimento e modulação do sistema imunitário, evitando o alojamento de patógenos na microbiota intestinal (LIWINSKI; ZHENG; ELINAV, 2020).

O eixo pré e probióticos exerce um papel central na seleção e desenvolvimentos de microecossistemas que compõem a microbiota de cada indivíduo (LIWINSKI; ZHENG; ELINAV, 2020). É um tema amplo e com um potencial grande para ser estudado, contudo, é ainda um assunto muito pouco explorado.

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

promovem melhor resposta do sistema imune frente a micro-organismos patogênicos invasores ou oportunistas, além de promoverem melhora na permeabilidade intestinal (SAAD, 2006).

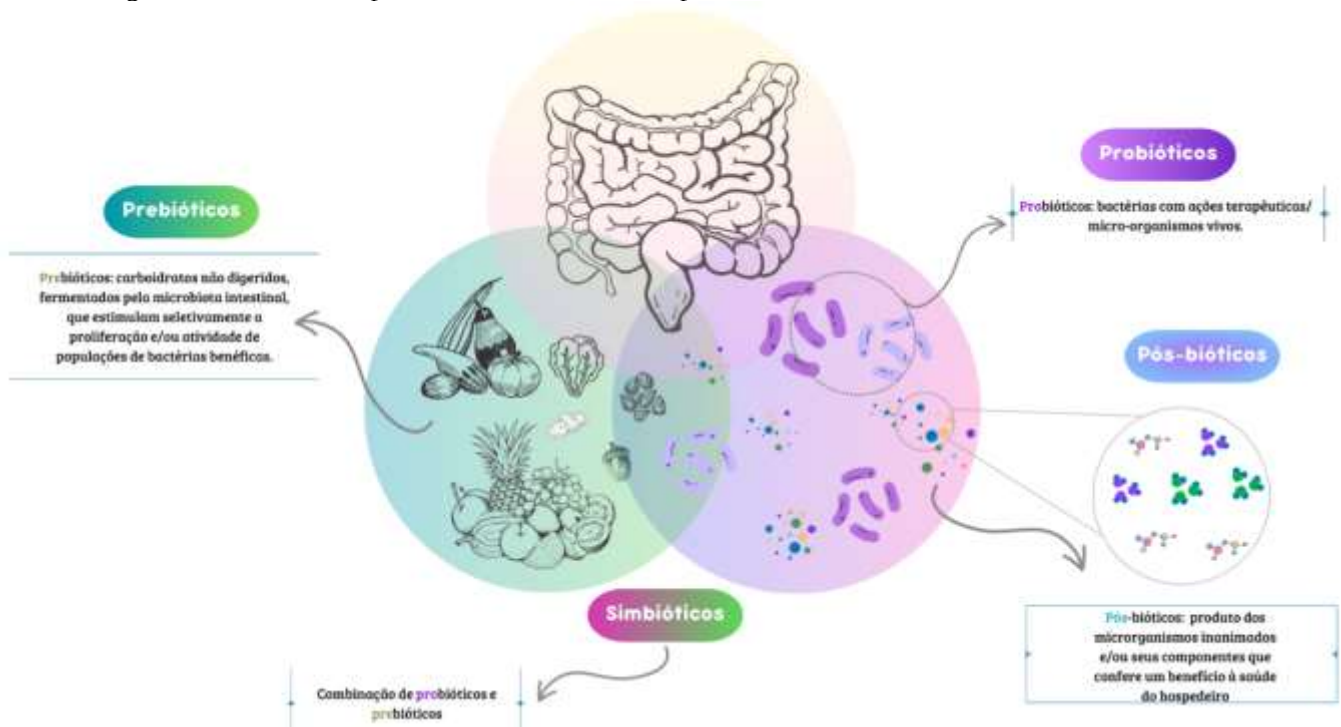
L. plantarum é uma bactéria probiótica que tem sido associada a uma série de benefícios para a saúde, incluindo a redução de fatores de virulência de patógenos. Os fatores de virulência são moléculas ou estruturas que permitem que um patógeno cause doença, nos quais podem incluir: toxinas, enzimas, aderências e cápsulas (LE; YANG, 2018).

A alimentação é uma variante importante quando se trata de auxiliar a manutenção da microbiota intestinal, pois por meio dela é possível adquirir nutrientes que são componentes responsáveis por manter os níveis metabólicos saudáveis do intestino e de todos os sistemas do corpo. Por meio da dieta é possível adquirir os prebióticos que são definidos pelo ISAPP como um substrato que é utilizado seletivamente por micro-organismos hospedeiros conferindo um benefício à saúde (SANDERS et al., 2019; FAVERO et al., 2022).

L. brevis BG18 e *L. plantarum* BG33 foram isolados proveniente de uma amostra de queijo tradicional turco Tulum, onde observou-se que as cepas produziam bacteriocinas, e demonstraram capacidade de inibir o crescimento de *S. aureus*, demonstrando propriedades probióticas contra patógenos de interesse clínico (UYMAZ; AKKOÇ; AKÇELIK, 2011). Curiosamente, mesmo após inúmeros estudos desvendarem o efeito antimicrobiano dos pré, pro e pós-bióticos, não há ainda diante deste cenário um estudo que realizou o detalhamento de todos os compostos presentes nesses princípios ativos, com a finalidade de verificar quais componentes são responsáveis por esses efeitos e como potencializá-los.

Os prebióticos são compostos que podem ser adquiridos por nutrientes ingeridos principalmente através da dieta, e são alimento para as bactérias benéficas do intestino. Os probióticos são micro-organismos vivos com ação benéfica no intestino que podem ser ingeridos por suplementação e quando administrados em doses adequadas atribuem diversos benefícios ao organismo. Os simbióticos são a junção dos prebióticos e probióticos (Figura 3), onde a sua ação sinérgica é capaz de promover a preservação dos probióticos por mais tempo, e os pós-bióticos são o produto dos micro-organismos inanimados ou seus componentes que possuem eficácia (FAVERO et al., 2022).

Figura 3 - Prebióticos, probióticos, simbióticos e pós-bióticos



Fonte: Elaboração própria

Outro benefício observado é a ação antialérgica dos probióticos, demonstrando ser um potencial objeto de estudo em pesquisas voltadas para área dermatológica. Foram testadas cepas de *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 0900, *Lactobacillus rhamnosus* LOCK 0908 e *Lactobacillus casei* LOCK 0918 em crianças até dois anos de idade que apresentavam dermatite atópica (DA) e alergia alimentar, onde receberam no período de 3 meses placebo ou uma preparação probiótica, foi observado que o grupo que recebeu probiótico teve uma redução significativa em seus sintomas, demonstrando a capacidade dos probióticos de intervir em patologias humanas e atenuar manifestações clínicas (CUKROWSKA et al., 2021)

Neste sentido, os estudos empregando probióticos e prebióticos podem ser um caminho para melhor compreender como ocorrem as interações entre micro-organismos no ecossistema denominado microbiota. Probióticos e prebióticos atuam em conjunto em uma interação simbiótica, capaz de trazer benefícios (KIM et al., 2019) e realizar a manutenção desse ecossistema, dando suporte à microbiota para que na presença de invasores patogênicos, a resposta imunológica do hospedeiro seja mais seletiva e eficaz (GOMEZ, 2019).

3.5. Pós-bióticos: uma nova perspectiva no combate as infecções

A definição pós-biótico no significado genuíno da palavra deriva do grego onde “pos” significa depois, e “bios”, que significa vida, ou seja, remete a um produto metabólico inanimado, quando os micro-organismos não evidenciam vida, onde tal produto é eficaz, eficiente e benéfico. O ISAPP em 2021, definiu um pós-biótico como "uma preparação de micro-organismos inanimados e/ou seus componentes que confere um benefício à saúde do hospedeiro", tal conceito de pós-biótico que uma parte ou o todo de determinado micro-organismo esteja inativo, independente dos produtos finais (FAVERO et al., 2022). A definição proposta pelo ISAPP é estimulante aos estudos que comprovem a eficácia dos pós-bióticos em diferentes microbiotas do organismo, sendo assim é uma área promissora nos estudos de animais domésticos ou selvagens, e para fins de saúde humana ou vegetal, a depender da evolução tecnológica e científica e importância dada a essa temática (VINDEROLA; SANDERS; SALMINEN, 2022).

O biofilme é um dos principais fatores de virulência de micro-organismos patogênicos, ele promove a adesão em alguma superfície de contato, forma uma matriz de exopolissacarídeos e inicia seu crescimento, essa formação ocorre para proteger o micro-organismo, manter sua sobrevivência e promover seu desenvolvimento (KASNOWSKI et al., 2010). Os pós-bióticos de *L. acidophilus* e *L. casei* foram investigados quanto a sua capacidade de remoção do biofilme de *S. aureus*. A técnica utilizou ensaio de microdiluição em caldo e difusão em ágar, os pós-bióticos adicionados foram capazes de remover consideravelmente, tendo *L. acidophilus* um desempenho moderadamente melhor que *L. casei* (KOOHESTANI et al., 2018).

Uma limitação nos avanços das pesquisas acerca dos pós-bióticos é a não elucidação completa dos mecanismos de ação e suas especificidades para cada sítio anatômico, entretanto, os dados já existentes comprovam que tais produtos indicam a presença de princípios ativos abrangendo atividade antioxidante, antimicrobiana e imunomoduladora que dispõem ao hospedeiro um reforço imunológico de forma rápida e eficaz. Outros estudos contribuem para desvendar os benefícios dos pós-bióticos, que afirmam que uma de suas propriedades é otimizar as funções da barreira intestinal e promover a saúde imunológica da microbiota, assim, dificultam a colonização de patógenos. O produto pós-biótico irá depender da cepa bacteriana que está sendo utilizada, meio de cultura e qual método e técnica estão sendo empregadas durante cada procedimento, pois cada variante interfere no resultado final do produto (LIANG; XING, 2023).

Potenciais aplicações clínicas dos pós-bióticos têm sido investigadas, com o propósito de delimitar os efeitos benéficos, e avaliar como esses produtos podem contribuir no combate a resistência aos antimicrobianos. O fato de os pós-bióticos não conterem micro-organismos vivos reduz os riscos atrelados a sua ingestão. ŻÓŁKIEWICZ et al., (2020), afirma que os pós-bióticos abrangem todas as substâncias de origem bacteriana ou fúngica que dispõem benefícios ao hospedeiro (ŻÓŁKIEWICZ et al., 2020).

3.5.1. Efeitos imunomoduladores mediados por Pós-bióticos

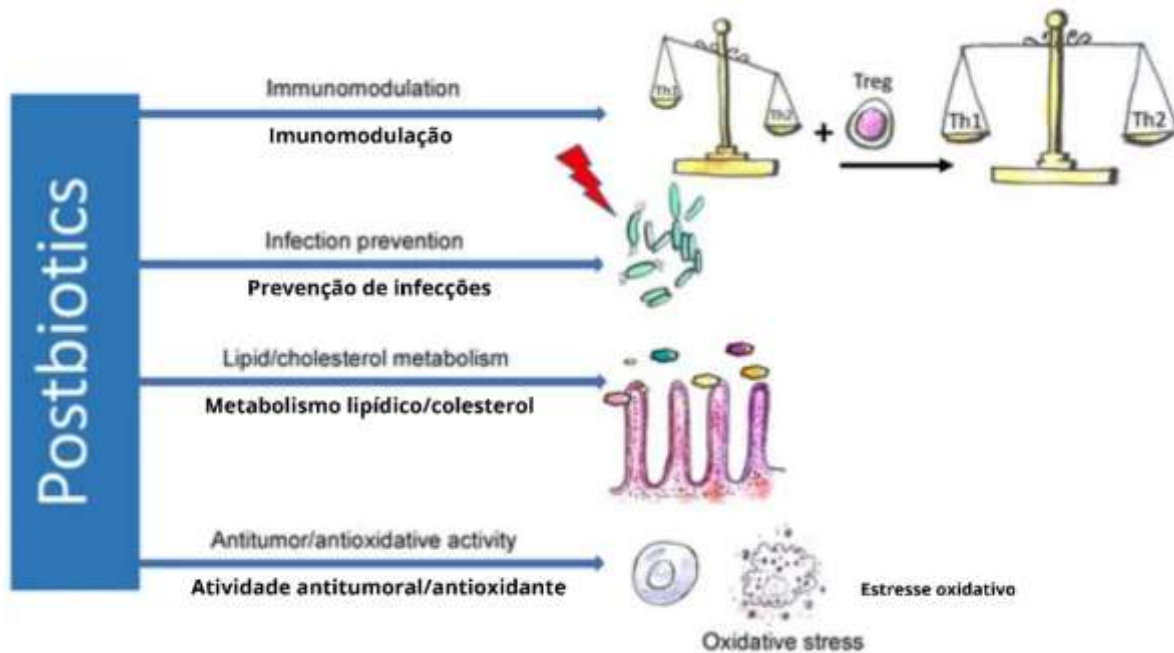
Os efeitos imunomoduladores da microbiota vêm sendo observados e investigados ao longo da história. O butirato de sódio é um importante imunomodulador, visto que é capaz de induzir a diferenciação de Linfócitos T reguladores (Treg). Algumas frações dos pós-bióticos também apresentam efeitos imunomoduladores, isolados de *Bacillus coagulans*, induzem a produção de citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-6 e IL-10). Em um estudo com camundongos, os pós-bióticos oriundos de *Streptococcus thermophilus* intensificaram a resposta dos linfócitos Th1 nos linfonodos mesentéricos, a comparação foi feita em relação aos controles. Essas especificidades comprovam a interferência dos pós-bióticos no sistema imunitário (ŻÓŁKIEWICZ et al., 2020; MÉNARD, 2005).

3.5.2. Efeitos antitumorais dos Pós-bióticos

Respostas anti-inflamatórias estão diretamente ligadas a carcinogênese, devido à cascata imunológica desencadeada na inflamação promover um desequilíbrio e posteriormente o câncer (ŻÓŁKIEWICZ et al., 2020). Esse risco ocorre devido a inflamação perdurar-se por muito tempo e prejudicar a resposta imune, consequentemente, impossibilita-o de reconhecer células cancerígenas. Logo, dado essa conexão, sugere-se que substâncias com efeitos anti-inflamatórios também possam ter efeitos antitumorais.

O sobrenadante de *L. rhamnosus* GG expandiu a expressão das proteínas de junção zona ocludens-1 (ZO-1) responsável pela estrutura correta das junções entre as células e a adesão celular, e reduziu a expressão de metaloproteinase de matriz-9 (MMP-9) que auxiliam na degradação da matriz intercelular, oportunizando a penetração das células cancerígenas, tal redução demonstra que os pós-bióticos têm um papel preventivo na carcinogênese (ESCAMILLA; LANE; MAITIN, 2012).

Figura 4 - Mecanismos de ação dos pós-bióticos



Fonte: Adaptado de ŻÓLKIEWICZ et al., 2020

3.6. Butirato de sódio como potencializador das atividades antimicrobianas

Interessantemente, a combinação de NaBut com os probióticos *Lactobacillus* spp., parece aumentar o papel protetor desta substância. Em um estudo conduzido por Wang e colaboradores (2018) foi observado que a combinação entre bactérias produtoras de butirato, como *Clostridium butyricum* em conjunto com *Lactobacillus acidophilus*, potencializou a atividade anti-inflamatória do NaBut (CHEN et al., 2018). Este achado permite hipotetizar que a combinação entre butirato e espécies de *Lactobacillus* sp. poderá oferecer potencial terapêutico até mesmo contra processos infecciosos causados por micro-organismos oportunistas.

3.6.1. Atividade antitumoral do NaBut

O potencial benéfico do NaBut é notavelmente relevante para o organismo humano. A partir de estudos que elucidem o percurso que o NaBut faz, será possível dispor do aproveitamento total de seus benefícios. A atividade antitumoral do NaBut pode ser observada em diversos estudos, XI et al., (2021) analisou a atividade anticancerígena e relataram a

capacidade do NaBut de induzir a apoptose, fazendo com que as células cancerígenas interrompessem sua propagação e instalação no colorretal (XI et al., 2021).

3.6.2. O papel do NaBut na inflamação

A compreensão do impacto do NaBut na inflamação elucida uma nova perspectiva acerca de sua aplicabilidade. A Enterocolite Necrosante (ECN) é uma inflamação grave no aparelho digestivo que comumente afeta recém-nascidos, principalmente, os pré-maturos. A microbiota intestinal estar desequilibrada ou a resposta imunológica estar acentuada são fatores que viabilizam a instalação e o agravamento da ECN. O NaBut foi utilizado como fármaco com o objetivo de amenizar a ECN provocada em camundongos. Além da melhora no peso corporal dos camundongos, o NaBut foi capaz de aumentar o índice de sobrevivência. Os camundongos tiveram as lesões intestinais reduzidas e aumentou significativamente a proporção de *Lactobacillus* enquanto inversamente proporcional reduzia a população de *Enterococcus* oportunistas. O NaBut foi capaz de reduzir a inflamação e harmonizar a microbiota intestinal, demonstrando dessa forma, seu potencial anti-inflamatório (SUN et al., 2021).

3.7. Antimicrobianos e Resistência

Os antimicrobianos são uma classe de fármacos que possui finalidade de combater diversos micro-organismos patogênicos que se instalam e causam diversos danos ao hospedeiro. Essa classe de fármacos pode se dividir em duas subclasses: antibióticos e quimioterápicos. Os quimioterápicos são medicamentos utilizados no tratamento de doenças neoplásicas, são administrados em concentrações que não prejudicam o hospedeiro e possuem a função de curar, proporcionar efeito paliativo e ampliar a sobrevida (VARAVALLO, 2011).

3.7.1. Antibióticos

Os antibióticos são medicamentos que foram desenvolvidos para matar, inibir ou reduzir o crescimento de bactérias. O uso adequado engloba um controle restritivo de horários a sua administração e dosagens recomendadas por profissionais de saúde habilitados. A população brasileira e dos demais países subdesenvolvidos é afetada por indicadores de analfabetismo relativamente elevados, por essa variante impactar diretamente no acesso ao conhecimento, uma das principais causas do uso inadequado de medicamentos é a falta de

informação. Os idosos são a população que mais consome medicamentos, e o declínio cognitivo é um impasse na administração adequada (SANTOS et al., 2013).

O recomendável é que tais medicamentos, sejam prescritos após a confirmação da infecção através de diagnóstico, para evitar o consumo incorreto e consequentemente acarretar resistência. Segundo os dados divulgados no relatório do *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) ou Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças, é notável a variedade e quantidade de antibióticos consumidos na Europa, sendo a Grécia o país de maior consumo no mundo, apresentando entre seus principais isolados de patógeno a bactéria *K. pneumoniae* em 2008 (LOUREIRO et al., 2016).

3. 7. 2. Resistência

A resistência aos antibióticos possui implicações clínicas e econômicas, impactando diretamente na morbidade e mortalidade. Essa condição ocorre principalmente por administrações incorretas, fora do intervalo e interrupção do tratamento quando ainda há recomendação de uso (LOUREIRO et al., 2016).

Embora o organismo realize a regulação de genes e bactéria, o mecanismo de resistência pode ocorrer por diversos estímulos, dentre eles, se não o principal: fatores evolutivos (LARSSON; FLACH, 2022).

A produção de beta-lactamases, enzimas capazes de inativar os antibióticos beta-lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos) através da hidrolização do anel beta-lactâmico, são um dos principais fatores de resistência (MOREJÓN, 2013).

Devido ao alarmante número de casos durante a pandemia da COVID-19, várias doenças foram negligenciadas pelo foco dos órgãos de saúde mundiais estarem voltados para redução dos danos causados pelo vírus. Paralelamente a pandemia, houve uma crescente resistência aos antimicrobianos, esse cenário ocorreu pelo número de pacientes internados no período pandêmico tratados com antibióticos não recomendáveis à sua condição de saúde. (REHMAN, 2023).

A administração de antimicrobianos em um paciente infectado pelo vírus só é justificável caso o mesmo tenha uma infecção secundária por fungo ou bactéria. Diversos estudos realizados em pacientes com infecção secundária avaliaram que há prevalência de

Enterobactérias, dentre as principais *K. pneumoniae* e ainda há registros de casos de *S. aureus* resistentes (REHMAN, 2023).

4. Materiais e Métodos

4.1. Origem e isolamento das linhagens

As espécies bacterianas *K. pneumoniae* (ATCC 13883) e *S. aureus* (ATCC 43300) empregadas neste estudo foram gentilmente cedidas pelo LACEN-DF (Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal). Já as linhagens de *Lactobacillus* escolhidos: *L. reuteri* (Lote: IE2702) e *L. rhamnosus* (LR-G14) (Lemma®) foram doadas pela Prof.^a Dr.^a Yanna Nóbrega, do Laboratório Microbiologia e Imunologia Clínica (LabMIC), do Departamento de Farmácia (FAR), da Faculdade de Ciências da Saúde (FS), Universidade de Brasília (UnB), mantidas durante a execução do projeto de mestrado.

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

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 l'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 mantidos a -20°C em microtubos com meio de cultura Mueller Hinton BROTH/Caldo para *K. pneumoniae* e *S. aureus* e para *L. reuteri* e *L. rhamnosus* LACTOBACILLI MRS BROTH Acumedia® 29 (Neogen do Brasil, São Paulo, Brasil), adicionando glicerol a 30% v/v.

Foram retiradas 15µL das cepas de *K. pneumoniae* e *S. aureus* e inoculadas inicialmente em meio de cultivo Mueller Hinton ágar (MH) para manutenção crescimento

substantial das amostras a serem testadas. O inóculo ficou em estufa de CO² (Fanem, São Paulo, Brasil) a 37°C, sem agitação, por 24h e depois mantidos na geladeira por até 10 dias para o próximo repique.

O inóculo dos *L. reuteri* e *L. rhamnosus* foi realizado com 15µL de suspensão-estoque, semeados em caldo MRS e inoculados por 48h em estufa a 37°C, também sem agitação.

As suspensões-estoque foram armazenadas (em eppendorf) sob refrigeração a -20°C, e os inóculos (em tubos do tipo falcon de 15 mL) foram utilizados logo após os tempos de crescimento em estufa.

4.3. Meios de cultivo

O meio de cultura para realização das análises de Concentração Inibitória Mínima (CIM) de *K. pneumoniae* e *S. aureus* foi Mueller Hinton (MH) (HIMEDIA, Brasil). As concentrações de íon cálcio e magnésio são ajustadas para fornecer as quantidades recomendadas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), acrescido dos seguintes: 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 a placa de *Lactobacillus* spp., os meios foram preparados na concentração 1x (padrão recomendado em bula) para os controles, e nos testes CIM na concentração de 2x (o dobro da concentração), devido a adição dos pós-bióticos diluírem o meio para concentração padrão de 1x.

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

4.4. Reagentes e soluções

Para o preparo dos reagentes, para o Butirato de Sódio (Cayman Chemical®, Michigan, Estados Unidos da América) foi confeccionada uma solução estoque, mantida a -20°C sob

proteção da luz, a uma concentração de 500 mM (molaridade), diluído em água para injetáveis (ISOFARMA®, Ceará, Brasil).

4.5. Ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os ensaios propostos para este estudo foram baseados nos protocolos do *Brazilian Antimicrobial Sensitivity Test Committee* (BRCAS) 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 1×10^5 células bacterianas 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 concentrada) seguindo para última fileira (menos concentrada).

Para os grupos teste, foram realizados e analisados da seguinte forma: (1) 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]. (2) 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 [3,125 mM], Linha 6 [1,562 mM], Linha 7 [0,781 mM] e Linha 8 [0,390 mM].

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

4.6.1. Preparo de pós-biótico de *L. reuteri* e *L. rhamnosus*

No preparo de pós-bióticos 1000 µl de *Lactobacillus* spp foram semeados em tubo do tipo falcon (50mL) contendo 20mL de MRS caldo para o crescimento de culturas puras e frescas, incubados em estufa a 37 °C por 48h. Após as 48h, se bem-sucedido o crescimento, foram centrifugados por 10 minutos a 2000 rotações por minuto (rpm), utilizando centrífuga TDL80-2B Arcano® (Novatécnica, São Paulo, Brasil)) e posteriormente filtradas com filtro de membrana estéril com poro de 0,22 µm e transferidas para outro tubo falcon estéril de 50 mL. Após filtração, os pós-bióticos foram estocados por até 3 dias a -5 °C, para serem posteriormente utilizados nas análises de CIM.

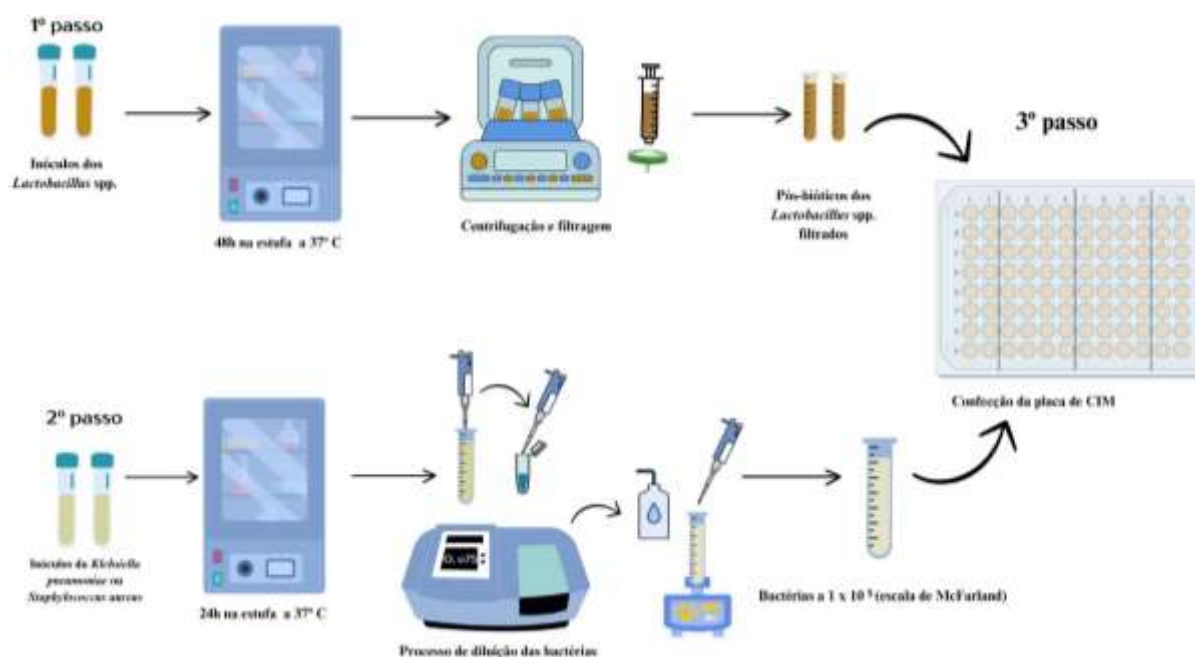
4.6.2. Semeio de *K. pneumoniae* e *S. aureus*

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

4.6.3. Ajuste de *K. pneumoniae* e *S. aureus* na escala McFarland.

As espécies bacterianas foram ajustadas utilizando a metodologia de espectrofotometria com o Espectrofotômetro BTS 310 (BioSystems®, Barcelona, Espanha). O equipamento foi calibrado para o comprimento de onda igual a 600 nm para leitura da Densidade Óptica (D.O.), configurado para leitura monocromática. As amostras foram acionadas para leitura e diluídas a partir do primeiro valor de absorbância em água destilada, até que se chegasse a uma absorbância entre 0,075 e 0,085, equivalente a 10^6 micro-organismos/mL. Após o ajuste de D.O., 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. O BRCAST preconiza o uso de salina no ajuste (ISO 2776-1:2019), entretanto, as bactérias utilizadas neste estudo não cresceram bem em salina, sendo utilizada água destilada.

Figura 5 - Esquema prático da metodologia

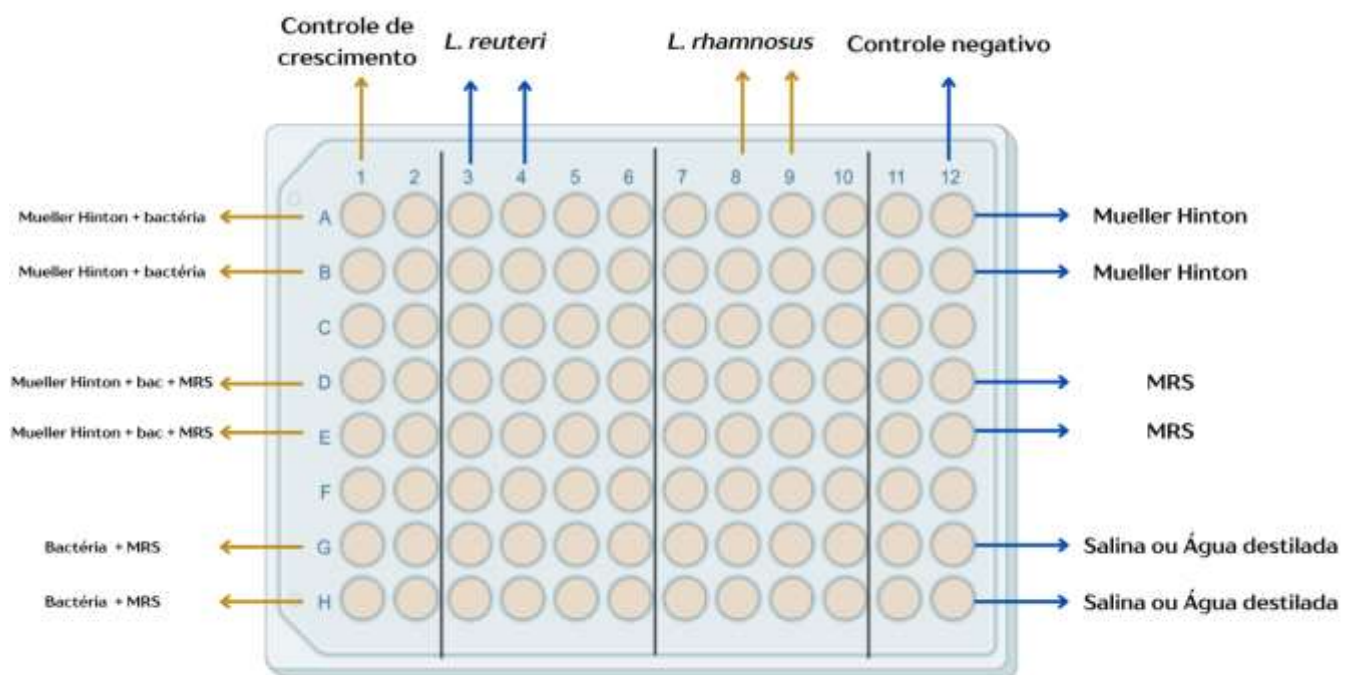


Fonte: elaboração própria

4.6.4. Execução da placa *Lactobacillus*

Em cada experimento foram confeccionadas duas placas, uma para *L. reuteri* e outra *L. rhamnosus*. A placa possui 12 colunas, sendo cada coluna um grupo de *Lactobacillus*, controle positivo e controle negativo e cada linha representando um valor da diluição seriada, como especificado acima na Figura 7 e demonstrado na Figura 6.

Figura 6 - Esquema da placa de 96 poços representando o planejamento do experimento com *Lactobacillus*



Fonte: elaboração própria

4.6.4.1. Volumes da placa *Lactobacillus*

A Tabela 1 descreve detalhadamente quais os volumes e substratos adicionados em cada poço, representando as linhas e colunas da placa representada na Figura 6. A coluna 1 representando o controle de crescimento, colunas 3 e 4 os testes com pós-bióticos de *L. reuteri*, colunas 8 e 9 os testes com pós-bióticos de *L. rhamnosus* e a coluna 12 representando o controle negativo.

Tabela 1 - Representação dos testes com pós-bióticos de *L. reuteri* e *L. rhamnosus*.

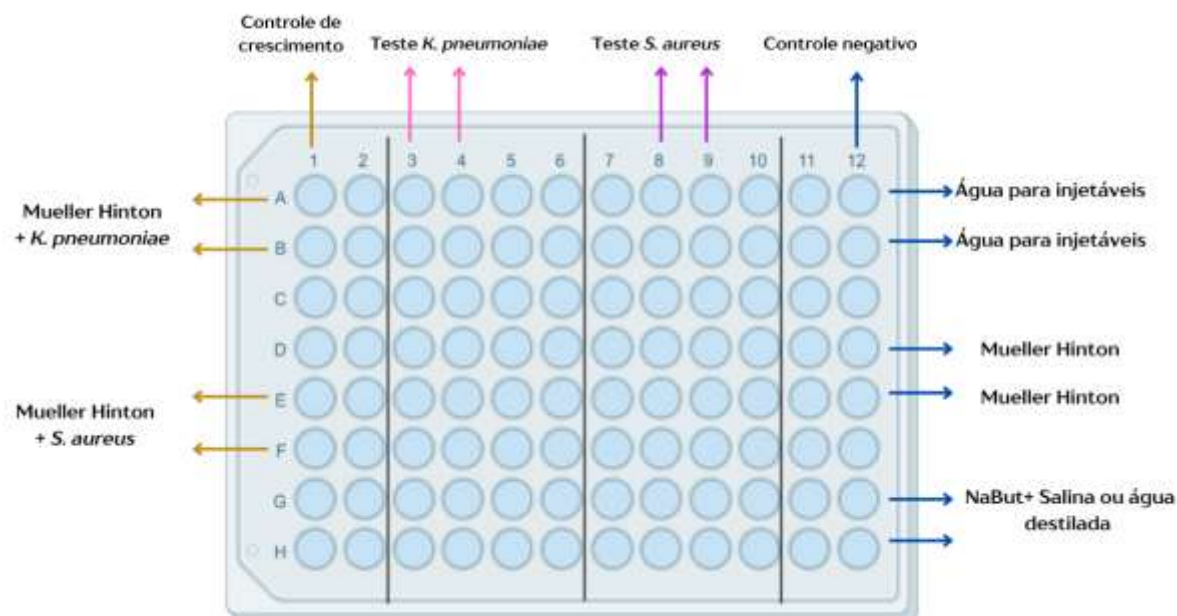
	Controle de Crescimento	Pós-biótico de <i>L. reuteri</i> (duplicata técnica)	Pós-biótico de <i>L. rhamnosus</i> (duplicata técnica)	Controle Negativo
Linha A	MH + bactéria (150 µl de MH + 10µl + <i>K. pneumoniae</i> ou <i>S. aureus</i>).	150µl de MH + 150 µl de pós-biótico de <i>L. reuteri</i> , retirado 150µl e transferido para o poço/linha seguinte + 10µl de <i>K. pneumoniae</i> ou <i>S. aureus</i> .	150µl de MH + 150 µl de pós-biótico de <i>L. rhamnosus</i> , retirado 150µl e transferido para o poço/linha seguinte + 10µl de <i>K. pneumoniae</i> ou <i>S. aureus</i> .	150µl de Mueller Hinton.
Linha B	MH + bactéria (150 µl de MH + 10µl + <i>K. pneumoniae</i> ou <i>S. aureus</i>).	150µl de MH + 150µl de pós-biótico retirado do poço anterior + 10µl de <i>K. pneumoniae</i> ou <i>S. aureus</i>	150µl de MH + 150µl de pós-biótico retirado do poço anterior + 10µl de <i>K. pneumoniae</i> ou <i>S. aureus</i>	150µl de Mueller Hinton
Linha D	MH + bactéria +MRS (75µl de MH+75µl MRS+10µl + de <i>K. pneumoniae</i> ou <i>S. aureus</i>).	150µl de MH + 150µl de pós-biótico retirado do poço anterior + 10µl de <i>K. pneumoniae</i> ou <i>S. aureus</i>	150µl de MH + 150µl de pós-biótico retirado do poço anterior + 10µl de <i>K. pneumoniae</i> ou <i>S. aureus</i>	150µl de MRS
Linha E	MH + bactéria +MRS (75µl de MH+75µl MRS+10µl + de <i>K. pneumoniae</i> ou <i>S. aureus</i>).	150µl de MH + 150µl de pós-biótico retirado do poço anterior + 10µl de <i>K. pneumoniae</i> ou <i>S. aureus</i>	150µl de MH + 150µl de pós-biótico retirado do poço anterior + 10µl de <i>K. pneumoniae</i> ou <i>S. aureus</i>	150µl de MRS
Linha G	Bactéria +MRS (75µl de meio+75µl MRS+10µl de + <i>K. pneumoniae</i> ou <i>S. aureus</i>).	150µl de MH + 150µl de pós-biótico retirado do poço anterior + 10µl de <i>K. pneumoniae</i> ou <i>S. aureus</i>	150µl de MH + 150µl de pós-biótico retirado do poço anterior + 10µl de <i>K. pneumoniae</i> ou <i>S. aureus</i>	150µl de água destilada ou salina.
Linha H	Bactéria +MRS (75µl de meio+75µl MRS+10µl de + <i>K. pneumoniae</i> ou <i>S. aureus</i>).	homogeneizado e retirado 150µl para concluir a diluição + 10µl de <i>K. pneumoniae</i> ou <i>S. aureus</i> .	homogeneizado e retirado 150µl para concluir a diluição + 10µl de <i>K. pneumoniae</i> ou <i>S. aureus</i> .	150µl de água destilada ou salina.

Legenda: A coluna 1 representando o controle de crescimento, 2 e 3 os testes com pós-bióticos de *L. reuteri* em duplicata técnica e coluna 4 representando o controle negativo.

4.6.5. Execução das Placas de NaBut

As bactérias foram semeadas em MH caldo, aproximadamente de 400 a 500µl de bactéria em 10 mL de meio MH, em tubo falcon de 15 mL. Após o semeio, os inóculos foram adicionados à estufa por 24h. Após isso foram ajustas empregando a escala de McFarland, até que se chegasse a uma absorbância entre 0,075 e 0,085, equivalente a 10^5 micro-organismos/mL correspondendo a aproximadamente 10^5 Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por mililitro. Como detalhado na Figura 6. Depois da diluição foram inseridas na placa.

Figura 7- Esquema da placa de 96 poços representando o planejamento do experimento com NaBut.



Fonte: Elaboração própria

4.6.5.1 Volume da placa de NaBut

Em cada experimento foram confeccionadas uma placa para *K. pneumoniae* e *S. aureus*. No primeiro poço da coluna 3 foi adicionado 160 µL de água para injetáveis (ISOFARMA®), e nos demais poços (B - H) pipetava-se 100 µl de água para injetáveis, em seguida pipetava-se no primeiro poço 40µl de NaBut e depois fazia-se a diluição seriada, retirando do primeiro poço (linha A) 100µl e passando para o segundo (linha B) até o último poço (linha H) seguindo diluição seriada e descartando 100 µl do último poço para concluir a diluição. Após a diluição foi acrescentado em todos os poços 100µl do master-mix (meio de cultivo MH + *K. pneumoniae* ou *S. aureus*), e encubado na estufa a 37°C por 24h.

Tabela 2 - Representação dos testes com butirato de sódio.

	Controle de Crescimento	Teste NaBut <i>K. pneumoniae</i>	Teste NaBut <i>S. aureus</i>	Controle Negativo
Linha A	MH + bactéria (150 µl de MH + 10µl + <i>K. pneumoniae</i> ou <i>S. aureus</i>).	160 µl de água para injetáveis + 40µl de NaBut e inicia-se diluição seriada + 100 µl de MH + <i>K. pneumoniae</i>	160 µl de água para injetáveis + 40µl de NaBut e inicia-se diluição seriada + 100 µl de MH + <i>S. aureus</i> .	150µl de água para injetáveis
Linha B	MH + bactéria (150 µl de MH + 10µl + <i>K. pneumoniae</i> ou <i>S. aureus</i>).	Diluição seriada _ + 100 µl de água para injetáveis + 100 µl de MH + <i>K. pneumoniae</i>	Diluição seriada _ + 100 µl de água para injetáveis + 100 µl de MH + <i>S. aureus</i> .	150µl de água para injetáveis
Linha D		Diluição seriada _ + 100 µl de água para injetáveis + 100 µl de MH + <i>K. pneumoniae</i>	Diluição seriada _ + 100 µl de água para injetáveis + 100 µl de MH + <i>S. aureus</i> .	150µl de Mueller Hinton
Linha E	MH + bactéria (150 µl de MH + 10µl + <i>K. pneumoniae</i> ou <i>S. aureus</i>).	Diluição seriada _ + 100 µl de água para injetáveis + 100 µl de MH + <i>K. pneumoniae</i>	Diluição seriada _ + 100 µl de água para injetáveis + 100 µl de MH + <i>S. aureus</i> .	150µl de Mueller Hinton
Linha G	MH + bactéria (150 µl de MH + 10µl + <i>K. pneumoniae</i> ou <i>S. aureus</i>).	Diluição seriada _ + 100 µl de água para injetáveis + 100 µl de MH + <i>K. pneumoniae</i>	Diluição seriada _ + 100 µl de água para injetáveis + 100 µl de MH + <i>S. aureus</i> .	NaBut (40µl) + Salina ou água destilada (110µl)
Linha H		homogeneizado e retirado 100µl para concluir a diluição + 100 µl de MH + <i>K. pneumoniae</i>	homogeneizado e retirado 100µl para concluir a diluição + 100 µl de MH + <i>S. aureus</i> .	NaBut (40µl) + Salina ou água destilada (110µl)

Legenda: A coluna 1 representando o controle de crescimento, 2 e 3 os testes com as bactérias em duplicata técnica e coluna 4 representando o controle negativo.

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 (PerkinElmer®, Brasil) com método de espectrofotometria, no comprimento de onda de 600 nm, em protocolo pré-estabelecido para leitura total da placa, as leituras foram capazes de calcular a absorbância da amostra por densidade óptica.

4.8. Análise Estatística

Os dados foram analisados com auxílio do programa *GraphPad Prism* (versão 8 para Windows). Os dados das curvas de crescimento foram inseridos no programa para confecção

das figuras, com seus valores de densidade óptica (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 do mesmo experimento para comprovação dos resultados.

As figuras foram esquematizadas em grupos A, B e C para os testes com *Lactobacillus*, e para os testes com NaBut em grupo A e B. E para as figuras de desvio-padrão representando os testes com *Lactobacillus* foram utilizados os grupos A, B, C e D, e para os testes com NaBut A, B e C. Os dados de controle e teste inseridos nas figuras, representam a média das análises realizadas em duplicata biológica com resultados similares...

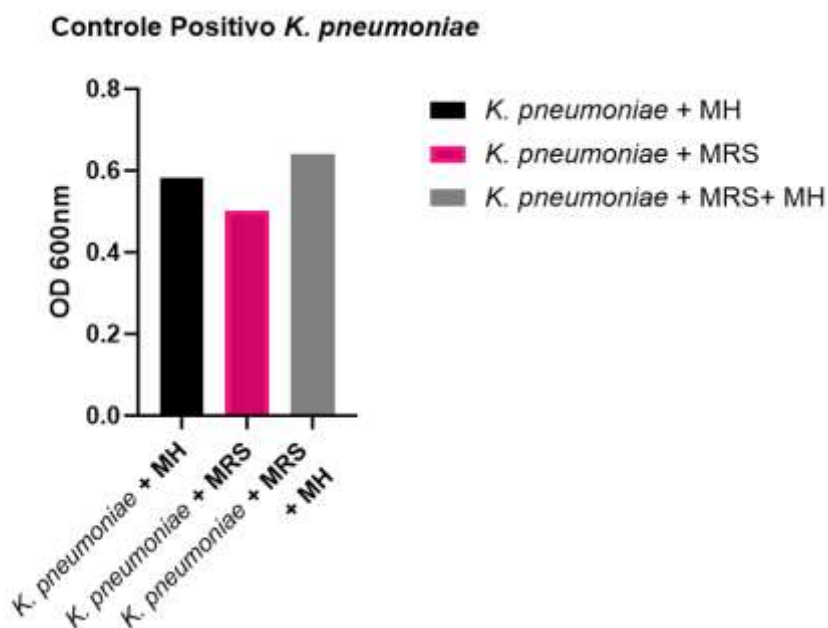
5. Resultados e Discussão

5.1. Análise de crescimento no meio MRS – estabelecendo controles

O crescimento de *K. pneumoniae* e *S. aureus* foi avaliado na presença do meio específico para *Lactobacillus*, MRS. Os grupos testados neste ensaio foram: meio MRS com adição de *K. pneumoniae* ou *S. aureus*, o meio MH com adição de *K. pneumoniae* ou *S. aureus*, o meio MRS na concentração de 50% + meio MH com adição de *K. pneumoniae* ou *S. aureus*. ambos ajustados na escala McFarland, como foi feito nos testes de CIM. O racional para escolha dessa análise de controle ocorreu para eliminar vieses dos efeitos do meio MRS sobre o crescimento das bactérias, o que poderia interferir no resultado real dos pós-bióticos, visto que, para estas análises é necessário adicionar o sobrenadante de culturas dos *Lactobacillus* previamente cultivados no MRS.

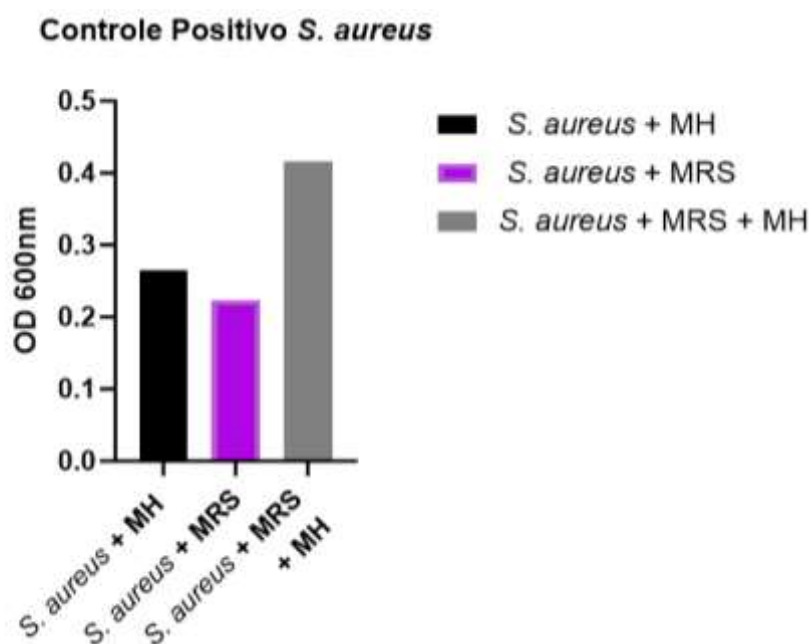
Os dados representados na Figura 8 descartam a hipótese de que *K. pneumoniae* teria seu crescimento prejudicado na presença do meio de cultura MRS, em sua concentração máxima testada [50% v/v], meio de cultivo próprio para *Lactobacillus* spp. O MRS é considerado seletivo para bactérias Gram-positivas, por inibir o crescimento de algumas espécies de bactérias Gram-negativas, variando a composição do meio a depender do fabricante.

Figura 8 - Controle positivo de *K. pneumoniae* nos meios de cultivo Mueller Hinton e MRS combinados e separadamente



A Figura 9 demonstra que o crescimento de *S. aureus* não foi prejudicado na presença do meio MRS. Embora *S. aureus* seja uma bactéria Gram-positiva, algumas fabricantes, como por exemplo KASVI, do meio MRS possuem especificações técnicas previstas em bula, e inibem algumas espécies Gram-positivas, como *S. aureus* (ATCC 25923).

Figura 9 - Controle positivo de *S. aureus* nos meios de cultivo *Mueller Hinton* e MRS combinados e separadamente



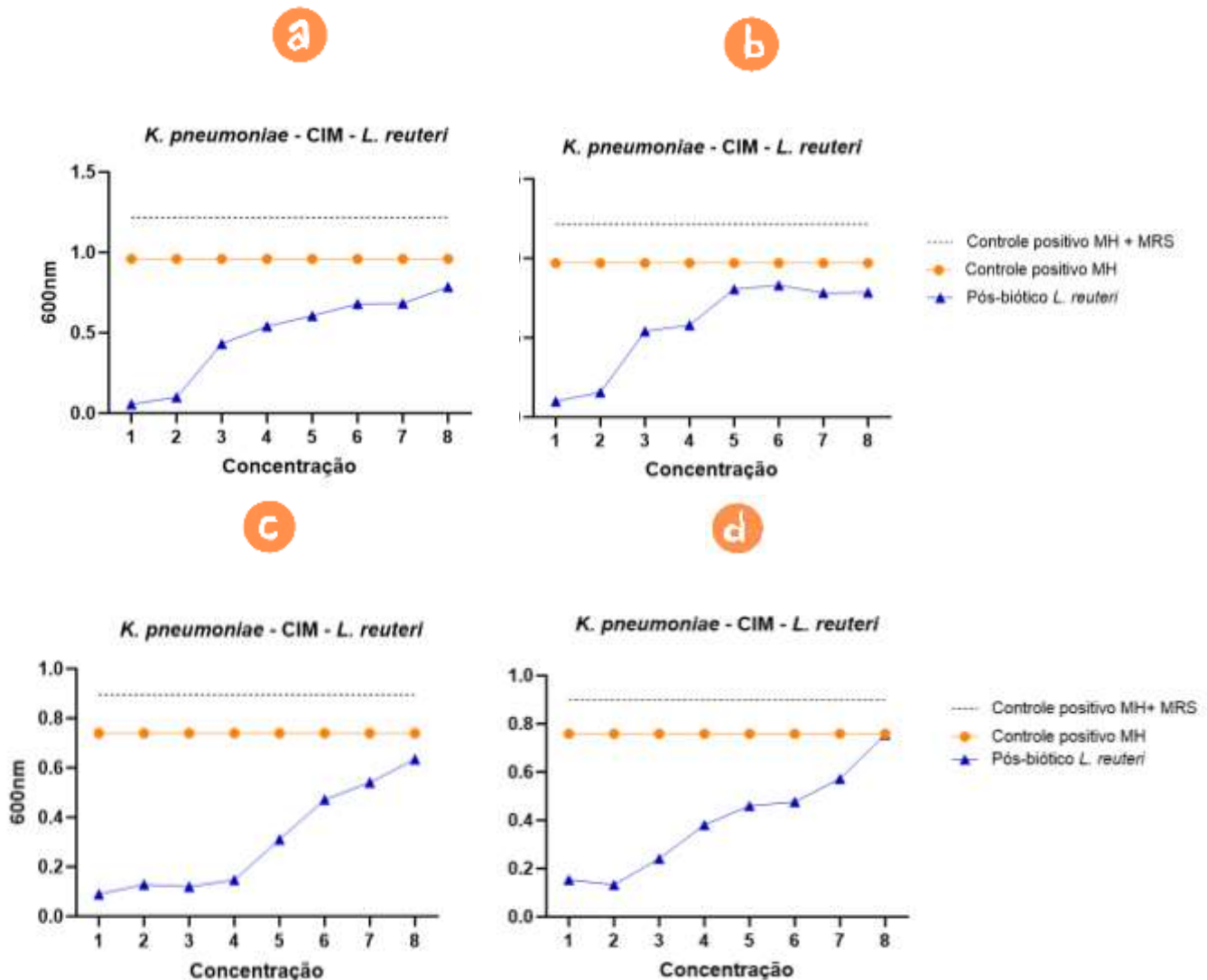
Com base nos resultados destes ensaios supracitados, foi estabelecido como controle positivo a combinação de MH + MRS 50% para todos os testes avaliando o efeito dos pós-bióticos sobre o crescimento dessas bactérias.

5.2. Testes CIM para *K. Pneumoniae* – pós-biótico de *L.reuteri*

Foram avaliadas concentrações diferentes do pós-bióticos de *L. reuteri* sobre crescimento em caldo de *K. pneumoniae*. Observa-se que o pós-biótico de *L. reuteri* reduziu o crescimento de *K. pneumoniae* nas concentrações de 50%, 25%, 12,5% e 6,25% (v/v), em relação ao controle (Figura 10). Nas demais concentrações, embora observa-se redução, há um crescimento exponencial da *K. pneumoniae* próximo ao controle, que representa o crescimento normal da bactéria à medida que bioativo reduz a dose. O pós-biótico foi capaz de reduzir o crescimento em todas as concentrações, exceto na Figura 10D, na qual a concentração de 0.39%

se igualou a linha de crescimento do grupo controle. Portanto, quanto maior a concentração, melhor o efeito inibidor do pós-biótico de *L. reuteri*, sugerindo um efeito dose-dependente.

Figura 10 - Efeito dose-dependente do pós-biótico de *L. reuteri* sobre o crescimento de *K. pneumoniae*

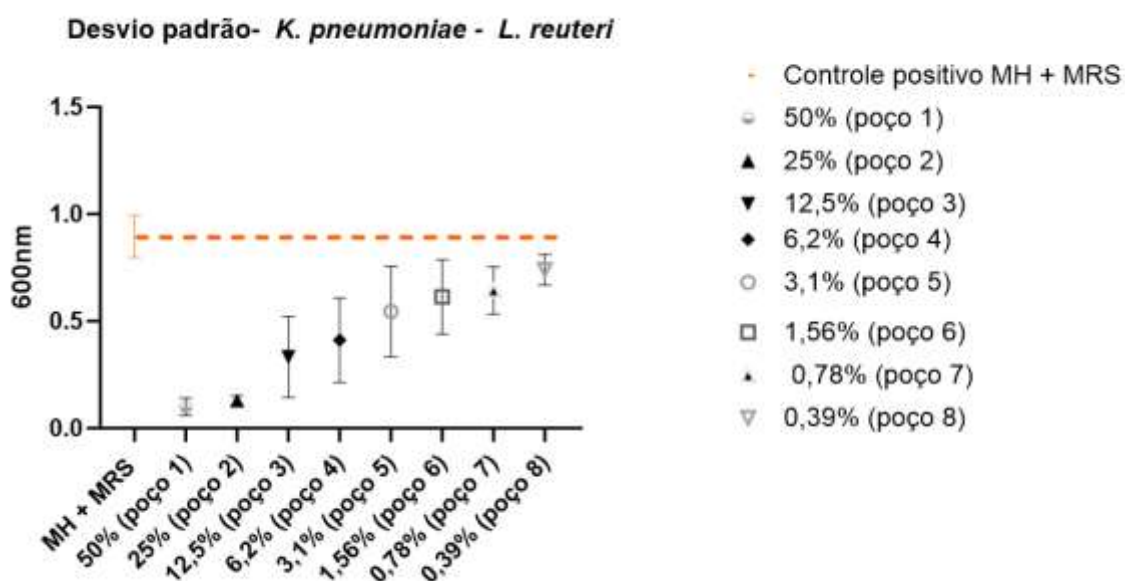


Legenda: A análise foi realizada no intervalo de crescimento de 24 horas. O eixo Y indica a densidade óptica (600 nm), o eixo X indica a concentrações seriadas dos compostos analisados. A numeração (1-8) no eixo X indica o sentido de concentração dos compostos testados, esses valores representam diluição 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 pontilhada preta representa o controle positivo com o meio MH com a presença do MRS e *K. Pneumoniae*. A linha **laranja** representa o controle positivo MH e *K. Pneumoniae*. A linha **azul** representa o teste: pós-biótico de *L. reuteri* seguindo diluição seriada e *K. Pneumoniae*. A Figura representa quadruplicata biológica com dados semelhantes.

A Figura 11 apresenta os desvios entre as repetições biológicas, demonstrando haver uma variação entre os grupos teste (concentrações diferentes de pós-bióticos) em relação a linha da média global do controle positivo (linha laranja pontilhado). Observa-se desvios-

padrões menores nas concentrações de 50 e 25%, sugerindo que essas concentrações do pós-biótico de *L. reuteri* apresentaram constância em seus resultados. As figuras de desvio-padrão foram confeccionados para auxiliar na análise dos dados, visando propor uma interpretação mais fidedigna, passível de discussão mais robusta.

Figura 11 - Análise do Desvio-padrão representando a variação, entre as réplicas biológicas, do efeito dose-dependente do pós-biótico de *L. reuteri* sobre o crescimento de *K. pneumoniae*



Legenda: 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 laranja representa a média global do controle positivo, com desvio em seu ponto inicial. As barras representam desvio-padrão das réplicas biológicas

L. reuteri é uma espécie probiótica que coloniza o organismo humano, incluindo microbiota intestinal, pele, trato urinário e leite materno. *L. reuteri* é capaz de produzir etanol, reuterina e ácidos orgânicos, que possuem atividade antimicrobiana, a partir desse fator auxilia na descolonização de micro-organismos capazes de gerar doença e melhoram a resposta imunitária. No que diz respeito a influência no sistema imunitário, é a capacidade do próbiótico reduzir citocinas pró-inflamatórias, pressuposto, a presença do *L. reuteri* na microbiota intestinal diminui a inflamação e uma possível progressão de doenças inflamatórias crônicas (MU; TAVELLA; LUO, 2018). Corroborando com os achados deste estudo, a atividade antibacteriana de *L. reuteri*, *L. rhamnosus* e *L. helveticus* foi observada contra isolados clínicos de *K. pneumoniae* e demonstraram inibição do crescimento.

Fedorova et al., (2018) constataram atividade antibacteriana contra *K. pneumoniae* fundamentado em três variantes de *Lactobacillus* spp. O estudo evidenciou que *Lactobacillus*

cultivados com as cepas de *K. pneumoniae* levaram a uma redução de 20% no primeiro dia e 86% no segundo. As cepas estudadas foram *L. rhamnosus*, *L. reuteri* e *L. helveticus*, obtendo proeminência a linhagem *L. rhamnosus* devido à indução de hidrolases de peptidoglicano, enzimas capazes de desintegrar a parede celular bacteriana (FEDOROVA et al., 2018).

L. delbrueckii é uma outra espécie probiótica que demonstrou que o pós-biótico produzido em seu sobrenadante inibiu o crescimento de *K. pneumoniae*. O ensaio realizado no estudo de MOGNA, et al., (2016) relatou que o efeito inibitório deve estar atrelado a produção de bacteriocinas, seguindo a metodologia de discos difusão após serem embebidos com 0,1 mL de sobrenadante. O halo de inibição foi próximo a 1 cm, demonstrando a partir desses dados que esta cepa probiótica pode ser adequada para aprimorar formulações probióticas e possivelmente neutralizar infecções por *K. pneumoniae* em humanos (MOGNA et al., 2016).

Vareille-Delarbre, et. al., (2019) constatou que *L. plantarum* CIRM653 reduziu a resposta inflamatória induzida por *K. pneumoniae* em camundongos. A atividade benéfica de *L. plantarum* para descolonizar *K. pneumoniae* foi observada *in vitro* e *in vivo*, onde *K. pneumoniae* teve a estrutura do seu biofilme modificada e reduzida por *L. plantarum*, validando a hipótese de que *Lactobacillus* spp. dispõe de princípios ativos contendo atividade antimicrobiana (VAREILLE-DELARBRE et al., 2019).

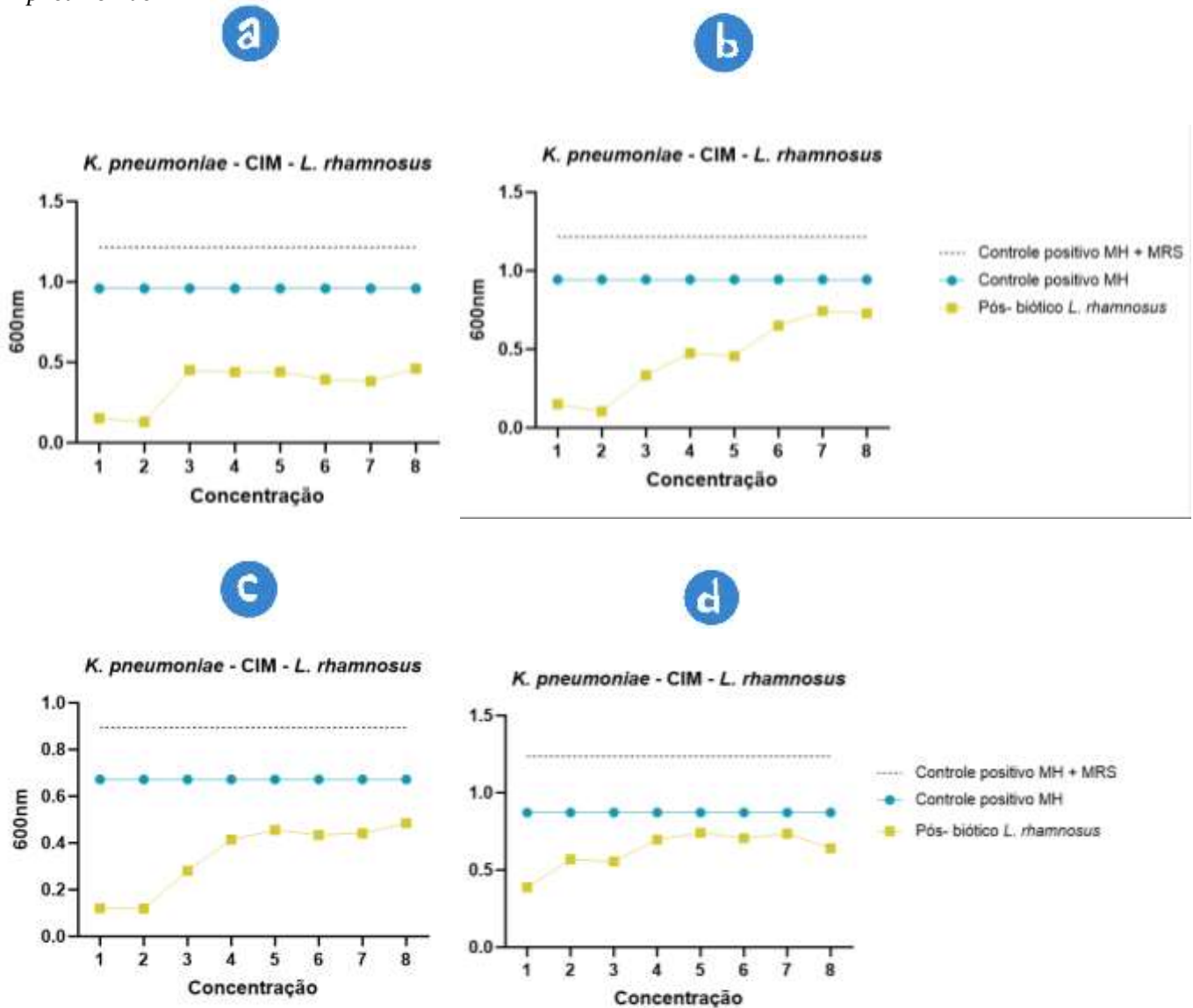
A atividade antimicrobiana de *Lactobacillus* spp. foi observada em um estudo que utilizou três cepas probióticas: LA 14, *L. acidophilus* (ATCC 4356) e *L. rhamnosus* (ATCC 9595) mediante quatro cepas de *Escherichia coli* isoladas de filés de tilápia (P12, P25, P35 e P36). O estudo efetivou a sensibilidade antimicrobiana através de um teste que teve como princípio a técnica da Concentração Inibitória Mínima (CIM), mesma técnica utilizada no presente estudo, tornando-se referência para a realização das metodologias (FERNANDES, 2019).

5.3. Testes CIM para *K. Pneumoniae* – pós-biótico de *L. rhamnosus*

Observa-se na Figura 12 que o pós-biótico de *L. rhamnosus* diminuiu o crescimento de *K. pneumoniae*, nas concentrações de 50%, 25%, 12,5%, 6,25% e 3,12%, em relação ao controle. Nas demais concentrações, embora se observa redução, há um crescimento exponencial próximo ao controle, que representa o crescimento normal da bactéria à medida que bioativo reduz a dose. O pós-biótico foi capaz de reduzir o crescimento em todas as

concentrações testadas, quanto maior a concentração maior o efeito inibidor do pós-biótico de *L. rhamnosus*, sugerindo um efeito dose-dependente.

Figura 12 - Efeito dose-dependente do pós-biótico de *L. rhamnosus* sobre o crescimento de *K. pneumoniae*



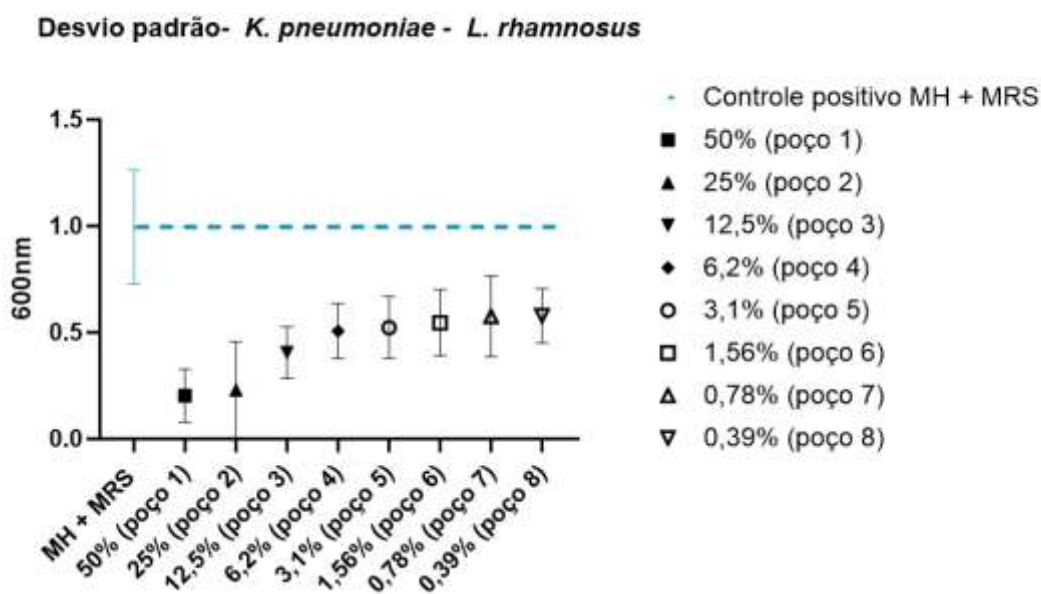
Legenda: A análise foi realizada no intervalo de crescimento de 24 horas. O eixo Y indica a densidade óptica (600 nm), o eixo X indica a concentrações seriadas dos compostos analisados A numeração (1-8) no eixo X indica o sentido de concentração dos compostos testados, esses valores representam diluição 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 pontilhada preta representa o controle positivo com o meio MH com a presença do MRS e *K. Pneumoniae*. A linha azul representa o controle positivo MH e *K. Pneumoniae*. A linha amarela representa o teste: pós-biótico de *L. rhamnosus* seguindo diluição seriada e *K. Pneumoniae*. As figuras representam quadruplicata biológica com dados semelhantes

Seguindo o mesmo racional deste trabalho, outro estudo avaliou o efeito benéfico da administração de *L. reuteri* em jejum para combater *Helicobacter pylori*. Foi observada, considerando que a cepa probiótica produziu um composto antibacteriano - 3-hidroxi propionaldeído (reuterina) que *L. reuteri* combate bactérias Gram-positivas e negativas. Tais benefícios de *L. reuteri* sendo utilizados em conjunto com omeprazol, erradicou *H. pylori* em 9 dos 15 pacientes avaliados após o estudo. O grupo controle tratado apenas com omeprazol não demonstrou nenhuma erradicação, supondo-se que a descolonização bacteriana ocorreu devido à presença do probiótico (DORE et al., 2014).

Em conjunto, os achados evidenciam a eficácia dos probióticos para diferentes linhagens bacterianas, sugerindo a necessidade investigações mais aprofundadas

A Figura 13 indica os coeficientes de variação entre os experimentos, demonstrando que há uma variação próxima entre as concentrações de 50 e 12,5%, e que estas concentrações do pós-biótico de *L. rhamnosus* apresentaram constância em seus resultados, e as demais concentrações apresentaram variações aproximadas.

Figura 13 – Análise do 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 *K. pneumoniae*



Legenda: 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 azul turquesa representa a media global do controle positivo, com desvio em seu ponto inicial. As barras representam desvio-padrão das replicatas biológicas

O trabalho de ABDELHALIM, et al., 2022, avaliou a capacidade antibacteriana *in vitro* do sobrenadante livre de células (CFS) de cepas selecionadas de *Lactobacillus* spp. (com propriedades probióticas) contra isolados clínicos de *K. pneumoniae* MDR. Os resultados demonstraram que entre dez *Lactobacillus* spp. testados houve um aumento significativo no valor médio do diâmetro do halo de inibição com *L. helveticus* (14,32 mm) e *L. rhamnosus* (13,3 mm), sendo estes os resultados mais expressivos do estudo (ABDELHALIM et al., 2022).

Consta que *K. pneumoniae* tem capacidade de induzir respostas do sistema imune por meio de reações pró-inflamatória; enquanto *L. rhamnosus* possui atividade anti-inflamatória, sendo recomendável para tratamento de patologias intestinais (BRAAT et al., 2004). Estudos observaram a interação entre *K. pneumoniae* e *L. rhamnosus*, avaliando como as Células Dendríticas (DC), apresentadoras de antígeno, se comportavam na presença das bactérias. As DC amadureceram na presença das bactérias, demonstrando o potencial de alteração e interação com o sistema imunitário, entretanto, a exposição de *K. pneumoniae* induziu a expressão dos receptores de ativação da resposta imunológica Th1 em DC. O estudo relatou que os probióticos possuem influência positiva na imunidade adaptativa e modulam a resposta imune, sendo seu uso recomendável no tratamento de patologias intestinais (BRAAT et al., 2004).

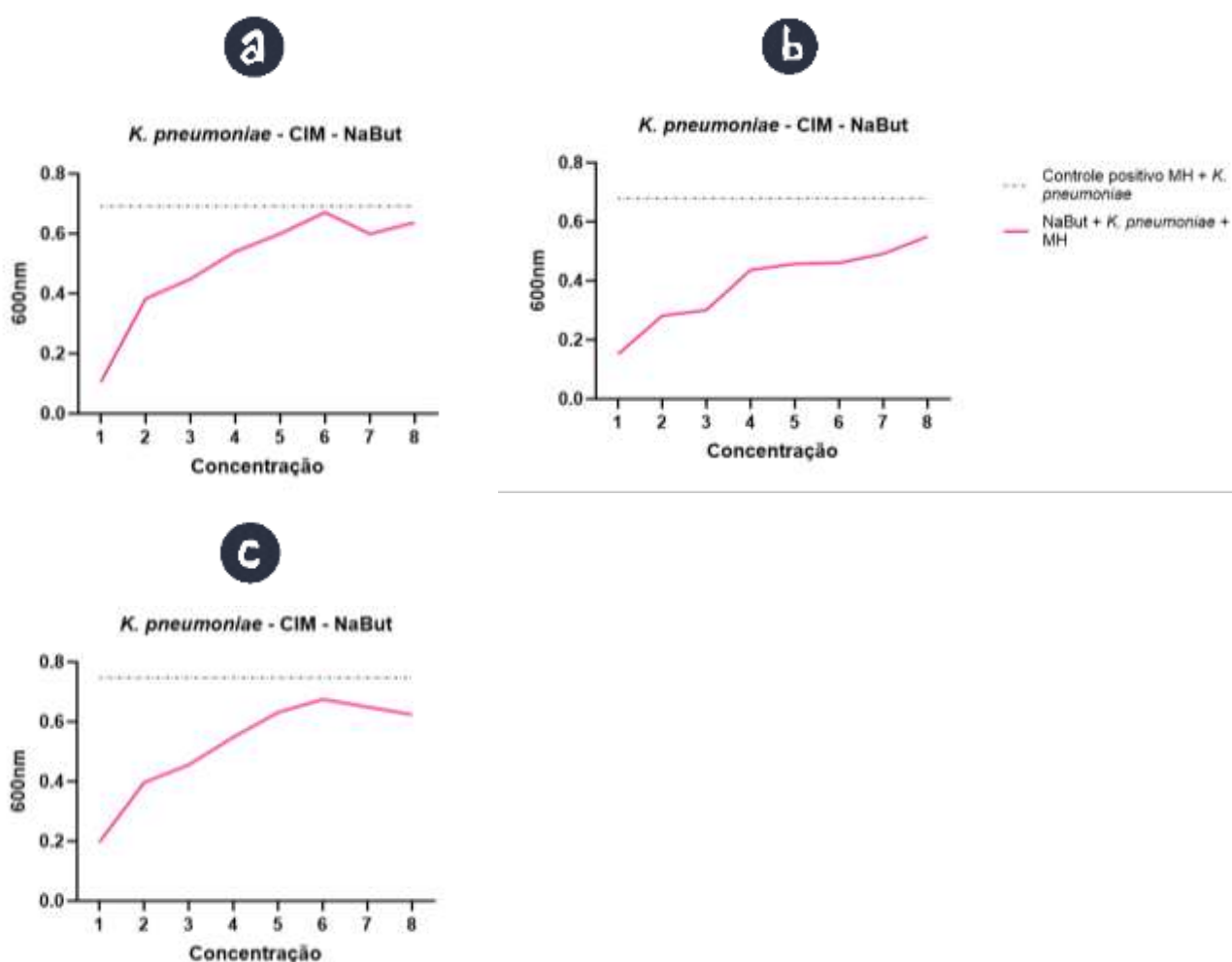
5.4. Testes CIM para *K. pneumoniae* – pós-biótico NaBut

O butirato de sódio (NaBut) apresenta diversos benefícios, alguns dos quais estão diretamente ligados com a homeostase intestinal. Chen et al., (2022), investigou os efeitos do NaBut em lesões intestinais e constatou que o mesmo possui capacidade de aliviar o estresse oxidativo e a lesão da barreira do epitélio intestinal (CHEN et al., 2018). Outra relevância clínica está no fato do NaBut ter demonstrado potencial para alterar os fatores de virulência de *Salmonella typhimurium*, impactando diretamente na colonização intestinal de suínos, resultando em uma redução significativa da bactéria, e demonstrando a atividade pró-biótica do AGCC (BOYEN et al., 2008).

O desequilíbrio da microbiota intestinal pode ser corrigido pelo NaBut, ZHOU, et al., (2017), relatou a partir dos seus ensaios que o NaBut promoveu uma estabilidade na homeostase intestinal de ratos com doença hepática e aumentou simultaneamente a disponibilidade de bactérias benéficas, dentre elas, *Lactobacillus* spp.. O NaBut reparou as lesões causadas na mucosa intestinal pela doença hepática e amenizou a esteato-hepatite. O potencial anti-inflamatório e equilibrante da microbiota intestinal do NaBut pode ser observado, sendo considerado um potencial modulador da microbiota intestinal (ZHOU et al., 2017).

Observa-se na Figura 14 que o NaBut reduziu o crescimento de *K. pneumoniae* nas concentrações de 50 mM, 25 mM, 12,5 mM e 6,25 mM em relação ao controle. Nas demais concentrações houve redução, porém próxima ao controle. Nas demais concentrações, embora se observa redução, há um crescimento exponencial de *K. pneumoniae* próximo ao controle, que representa o crescimento normal da bactéria à medida que NaBut diminui sua concentração no meio, conforme diluição seriada.

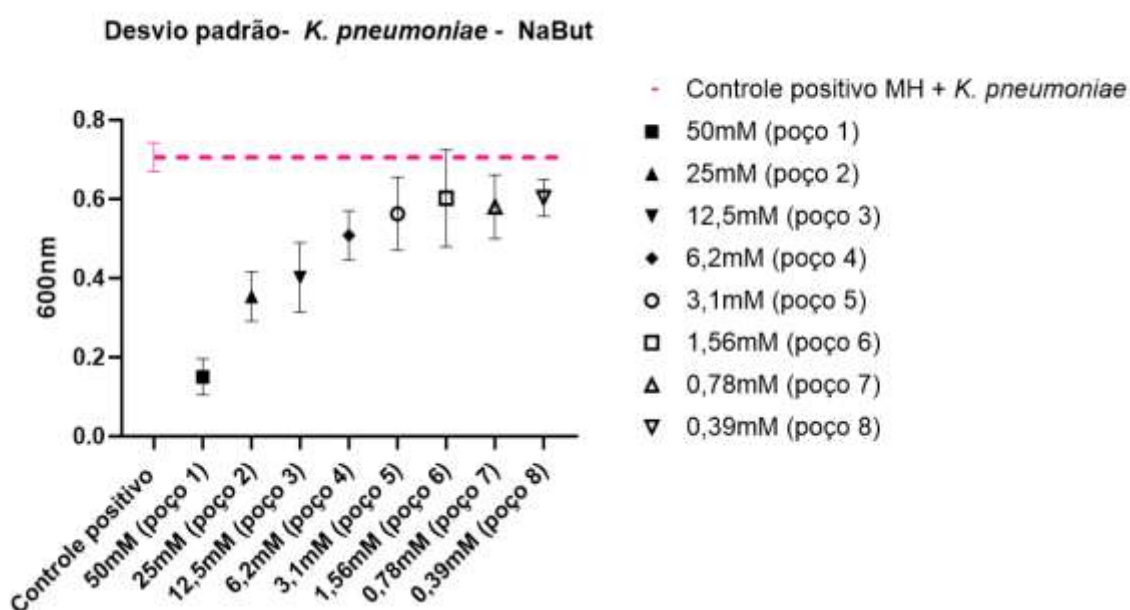
Figura 14 - Efeito dose-dependente de NaBut sobre o crescimento de *K. pneumoniae*



Legenda: 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 concentrações seriadas do reagente analisado, do mais concentrado para o menos concentrado. A linha preta pontilhada representa o controle positivo, poço que contém apenas *K. pneumoniae* e MH. A linha rosa 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]. As figuras representam triplicata biológica com dados semelhantes

A Figura 15 indica os coeficientes de variação entre os experimentos, demonstrando que há uma variação próxima entre as concentrações de 25 e 12,5 mM, e 0,78 e 0,39 mM. Estas concentrações do NaBut apresentaram constância em seus resultados, e as demais concentrações apresentaram variações aproximadas.

Figura 15 –Análise do Desvio-padrão representando o grau de variação do efeito dose-dependente NaBut sobre o crescimento de *K. pneumoniae*



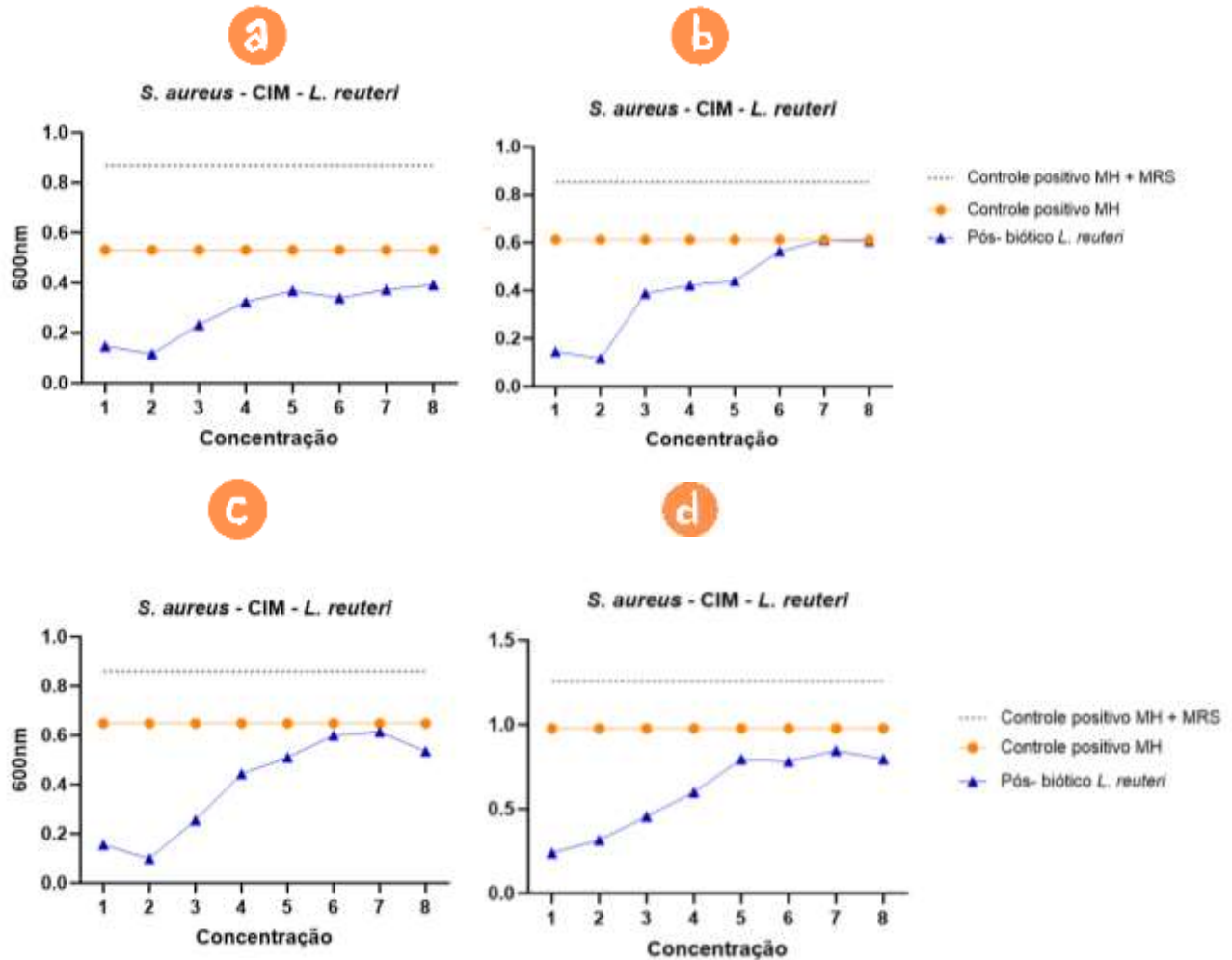
Legenda: O eixo Y indica a densidade óptica (600 nm), o eixo X indica a concentrações seriadas dos compostos analisados O eixo X indica o sentido de concentração dos compostos testados, esses valores representam diluição seriada dos compostos analisados da maior a menor concentração. A linha pontilhada rosa representa a media global do controle positivo, com desvio em seu ponto inicial. As barras representam desvio-padrão das replicatas biológicas

5.5. Testes CIM para *S. aureus* – pós-biótico de *L.reuteri*

Os testes com *S. aureus* foram realizados com as mesmas linhagens de *Lactobacillus* dos testes de *K. pneumoniae*. Seguindo o protocolo de diluição seriada, da maior concentração para a menor, iniciando o primeiro poço com 50% de concentração e caindo para 25%, até o último poço. Os pós-bióticos foram cultivados e após seu crescimento avaliado inseridos na placa, e os dados inseridos na figura para análise comparativa. Observa-se na Figura 16 que o pós-biótico de *L. reuteri*, reduziu o crescimento de *S. aureus* nas concentrações de 50%, 25%, 12,5% e 6,25%, as concentrações 1,56% e 0,78% se aproximaram do controle em 3 dos 4 testes considerados nesse estudo, representando um efeito não significativo em ambas. Nas demais

concentrações houve redução, porém próxima ao controle, que representa o crescimento normal da bactéria na ausência do bioativo.

Figura 16 - Efeito dose-dependente do pós-biótico de *L. reuteri* sobre o crescimento de *S. aureus*

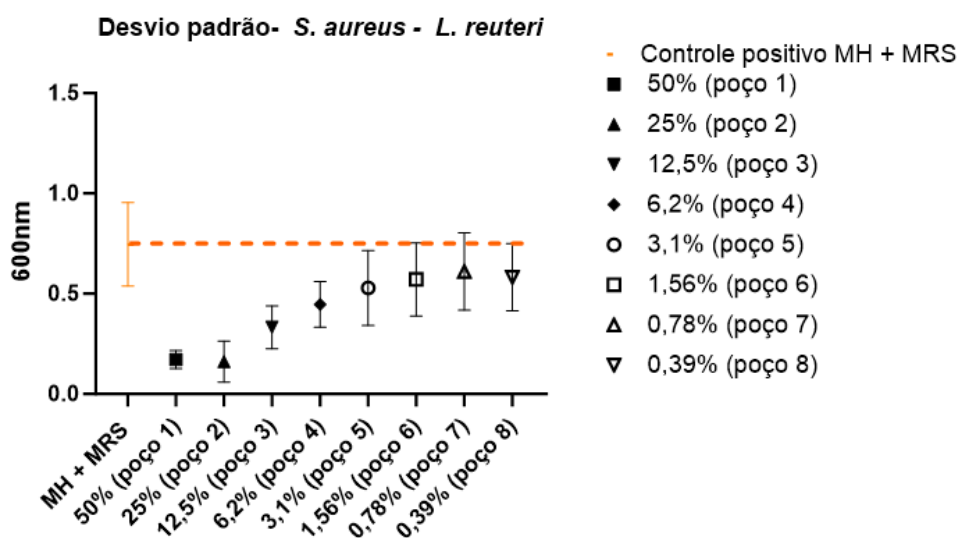


Legenda: A análise foi realizada no intervalo de crescimento de 24 horas. O eixo Y indica a densidade óptica (600 nm), o eixo X indica a concentrações seriadas dos compostos analisados. A numeração (1-8) no eixo X indica o sentido de concentração dos compostos testados, esses valores representam diluição 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 pontilhada preta representa o controle positivo com o meio MH com a presença do MRS e *S. aureus*. A linha laranja representa o controle positivo MH e *S. aureus*. A linha azul representa o teste: pós-biótico de *L. reuteri* seguindo diluição seriada e *S. aureus*. As figuras representam quadruplicata biológica com dados semelhantes.

A Figura 17 indica os coeficientes de variação entre os experimentos, demonstrando que há uma variação próxima entre as concentrações de 50, 25 e 12,5%. Estas concentrações do pós-biótico de *L. reuteri* apresentaram constância em seus resultados e houve maior

redução nas concentrações de 50 e 25%. O desvio-padrão do controle demonstrou que houve variação no crescimento natural de *S. aureus* somente na presença dos meios de cultura. Os gráficos de desvio-padrão foram confeccionados para legitimar a proximidade dos dados, e com o objetivo de propor uma observação unificada.

Figura 17- Análise do Desvio-padrão representando o grau de variação do efeito dose-dependente do pós-biótico de *L. reuteri* sobre o crescimento de *S. aureus*



Legenda: O eixo Y indica a densidade óptica (600 nm), o eixo X indica as 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 laranja representa a média global do controle positivo, com desvio em seu ponto inicial. As barras representam desvio-padrão das replicatas biológicas.

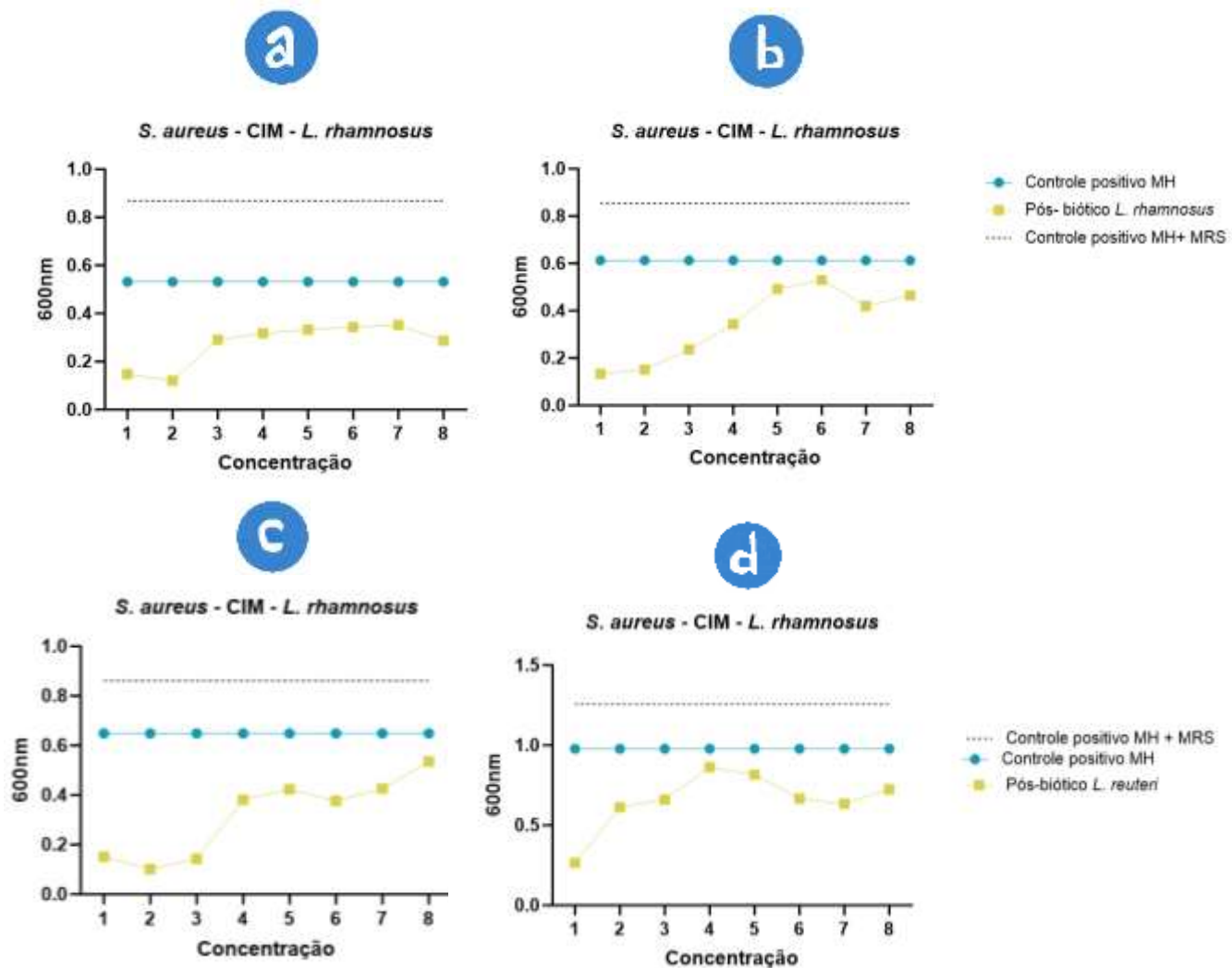
5.6. Testes CIM para *S. aureus* – pós-biótico de *L. rhamnosus*

L. rhamnosus é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia, e uma das cepas probióticas mais estudadas do mundo desde sua descoberta em 1985. Possui propriedades antibacterianas, e foi capaz de inibir a adesão de *S. aureus* aos queratinócitos, que produzem queratina e possuem a função de promover uma barreira protetora na pele, além disso o *L. rhamnosus* e o seu pós-biótico inibiram o crescimento de *S. aureus*, apresentando assim duas propriedades benéficas da variante probiótica (MOHAMMEDSAEED et al., 2014).

Observa-se na Figura 18 que o pós-biótico de *L. rhamnosus* reduziu significativamente o crescimento de *S. aureus* nas concentrações de 50%, 25% e 12,5%, em relação ao controle. Nas demais concentrações houve redução, e um aumento nas concentrações de 6,25% e 3,12% em pelo menos 3 dos resultados inseridos nos gráficos. Nas demais concentrações, embora se

observe redução, há um crescimento exponencial próximo ao controle, que representa o crescimento normal da bactéria à medida que bioativo reduz a dose. Outro fenômeno observado foi a redução do crescimento nas últimas concentrações, com ênfase em 1,56% e 0,58%. O pós-biótico foi capaz de reduzir o crescimento de *S. aureus* em todas as concentrações, e demonstrou que quando maior a concentração, melhor o efeito microbicida do pós-biótico.

Figura 18 - Efeito dose-dependente do pós-biótico de *L. rhamnosus* sobre o crescimento de *S. aureus*

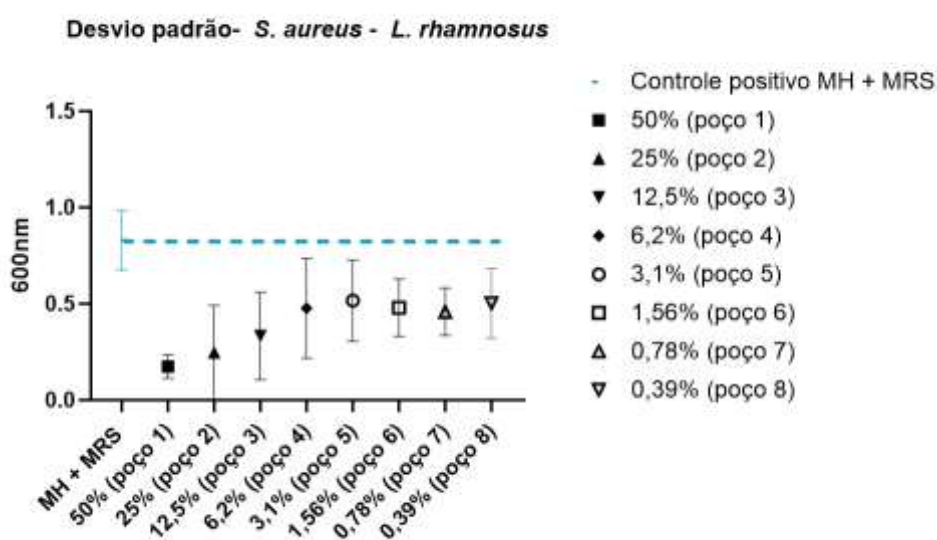


Legenda: A análise foi realizada no intervalo de crescimento de 24 horas. O eixo Y indica a densidade óptica (600 nm), o eixo X indica a concentrações seriadas dos compostos analisados A numeração (1-8) no eixo X indica o sentido de concentração dos compostos testados, esses valores representam diluição 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 pontilhada preta representa o controle positivo com o meio MH com a presença do MRS e *S. aureus*. A linha azul turquesa representa o controle positivo MH e *S. aureus*. A linha amarela representa o teste: pós-biótico de *L. rhamnosus* seguindo diluição seriada e *S. aureus*. As figuras representam quadruplicata biológica com dados similares

As linhagens probióticas *L. brevis* e *Bifidobacterium bifidum* também foram capazes de reduzir o crescimento de *S. aureus*, demonstrando através do compilado de estudos apresentados neste estudo, que diversas espécies probióticas possuem atividade antibacteriana, sugerindo que um efeito conjunto potencialize o efeito (MORAES et al., 2019).

A Figura 19 indica os coeficientes de variação entre os experimentos, demonstrando que há uma variação próxima entre as concentrações de 50 e 12,5%, e nas concentrações 1,56 e 0,78%, explanando que estas concentrações do pós-biótico de *L. rhamnosus* apresentaram constância em seus resultados, e as demais concentrações apresentaram variações aproximadas.

Figura 19 - Análise do Desvio-padrão representando o grau de variação do efeito dose-dependente do pós-biótico



Legenda: 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 azul turquesa representa a media global do controle positivo, com desvio em seu ponto inicial. As barras representam desvio-padrão das replicatas biológicas.

Outro estudo, com foco em cepas probióticas, relatou que o caldo de cultura *L. plantarum* apontou atividade inibitória contra isolados de *S. aureus*, validando a hipótese de que há uma potencial atividade antimicrobiana proveniente destes substratos (MUSA, 2022).

A necessidade de investigar patógenos de origem alimentar vem crescendo exponencialmente, a partir disso, probióticos como *L. rhamnosus*, se tornaram foco de diversos estudos. *L. rhamnosus* foi capaz de reduzir a formação de biofilme de *Salmonella enterica*, demonstrando que sua presença promove redução de crescimento onde há colonização dessa cepa bacteriana *L. rhamnosus* possui ação biossurfactante, mudando a tensão superficial do

meio emulsificando-o e tornando-o mais propício para o seu crescimento (NITSCHKE; PASTORE, 2002; .

No estudo de FORKUS, et al. (2017), comprova-se a eficiência e atividade antimicrobiana dos probióticos, podendo-se observar em seus ensaios uma significativa redução de *S. enterica* nos tratos gastrointestinais de aves de capoeira (domesticadas), que são hospedeiras assintomáticas, viabilizando uma disseminação rápida do patógeno. Foi possível assistir uma significativa melhoria nas contagens de *S. enterica* após administração do probiótico (FORKUS et al., 2017).

Previamente a conclusão de que determinados probióticos conferem benefícios a saúde é necessário verificar a viabilidade celular, no entanto, a ausência da disponibilidade celular está em conjunto com ausência de benefício ao hospedeiro, onde seus produtos metabólicos podem apresentar até mesmo ameaça à saúde. Os cientistas elucidaram diversas nomenclaturas para caracterizar esses elementos inviáveis: probióticos não viáveis, probióticos mortos pelo calor, probióticos tinalizados, lisados celulares, *ghostbiotics* e pós-bióticos, o que apesar de não individualizar a definição, dá aos termos uma amplitude indesejada para a ciência devido a necessidade de esclarecer e especificar os significados, conceitos e mecanismos (VINDEROLA; SANDERS; SALMINEN, 2022).

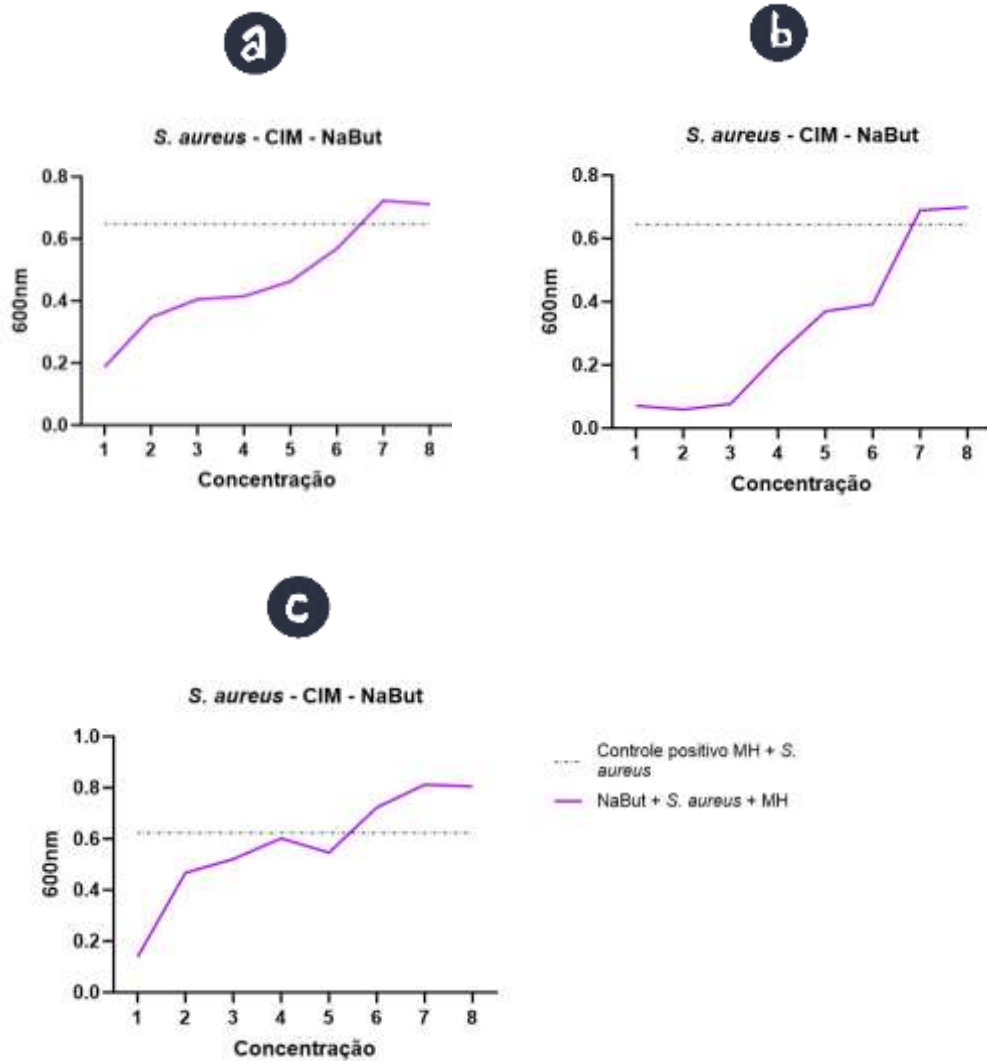
5.7. Testes CIM para *S. aureus* – pós-biótico de NaBut

A eficácia do NaBut foi observada em um estudo que avaliava o potencial anti-inflamatório mediado por inibição das histonas desacetilases (HDACi) suavizando a produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias, agindo como *feedback* imunitário aos lipopolissacarídeos em macrófagos. Tal inibição, modulada por butirato também possui ação neuroprotetora promovendo a preservação dopaminérgica e de possíveis danos ao DNA (Ácido Desoxirribonucleico), como demonstrado em estudos realizados *in vitro*. Em um ensaio realizado *in vivo* com Doença de Parkinson de drosófila, observou-se que NaBut melhorou significativamente os déficits locomotores e decaiu os índices de mortalidade (CANTU-JUNGLES; RASMUSSEN; HAMAKER, 2019).

Observa-se na Figura 20 que o NaBut reduziu significativamente o crescimento de *S. aureus* nas concentrações de 50 mM, 25 mM, 12,5 mM, 6,25 mM e 3,12 mM em relação ao controle, como demonstrado na Figura 21 A e B. Nas demais concentrações houve um crescimento capaz de superar o controle, hipotetizando que as concentrações 0.78 mM e 0.39

mM favorecem o crescimento da bactéria. O NaBut na maior concentração, demonstrou efeito redutor no crescimento de *S. aureus*, e na menor concentração favoreceu seu crescimento.

Figura 20 - Efeito dose-dependente de NaBut sobre o crescimento de *S. aureus*

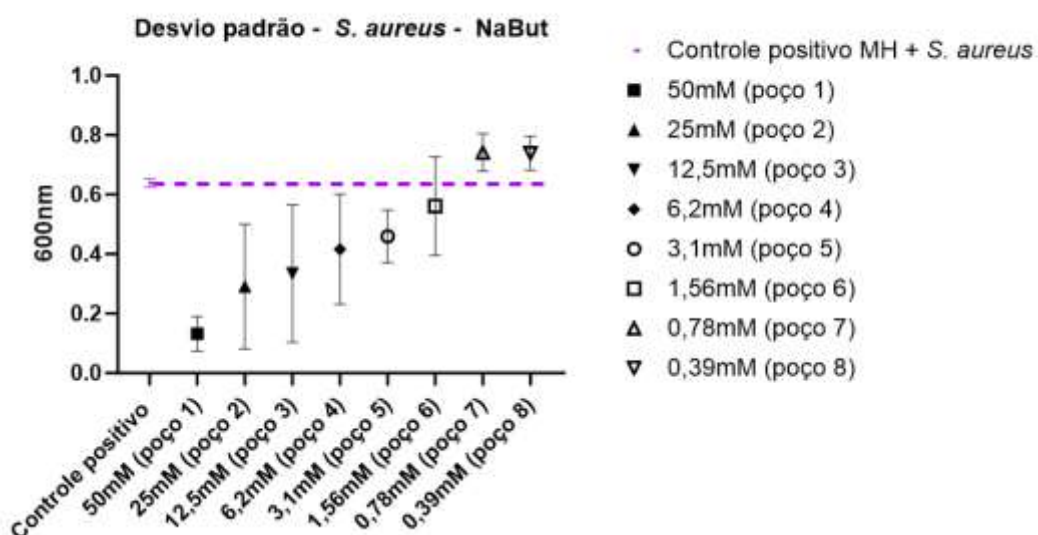


Legenda: A análise foi realizada no intervalo de crescimento de 24 horas, seguindo o mesmo protocolo de diluição dos *Lactobacillus* spp. O eixo Y representa a densidade óptica (OD 600 nm), o eixo X (1-8) representa as concentrações seriadas do reagente analisado, do mais concentrado para o menos concentrado. A linha preta pontilhada representa o controle positivo, poço que contém apenas *S. aureus* e MH. A linha **roxa** 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]. As figuras representam triplicata biológica com dados semelhantes

Chen, Guangxin et al., 2018, investigou as atividades anti-inflamatórias do NaBut e ações benéficas na parede intestinal, e constatou em seu estudo que o NaBut melhorou significativamente a resposta inflamatória e a disfunção da barreira do epitélio intestinal em camundongos, reforçando o efeito complementar com probióticos para promover a descolonização de micro-organismos invasores (CHEN et al., 2018).

A Figura 21 indica os coeficientes de variação entre os experimentos, demonstrando que há uma variação próxima entre as concentrações de 25 e 12,5 mM, onde é possível observar uma redução do crescimento e nas concentrações de 0,78 e 0,39 mM nos quais o crescimento na presença do NaBut foi favorecido, superando a linha do controle. Estas concentrações do NaBut apresentaram constância em seus resultados, e as demais concentrações apresentaram variações aproximadas. A concentrações de alta molaridade de NaBut pode reduzir o crescimento de *S. aureus*, e as baixas concentrações demonstraram o fenômeno de favorecer o seu crescimento.

Figura 21– Análise do Desvio-padrão representando o grau de variação do efeito dose-dependente NaBut sobre o crescimento de *S. aureus*.



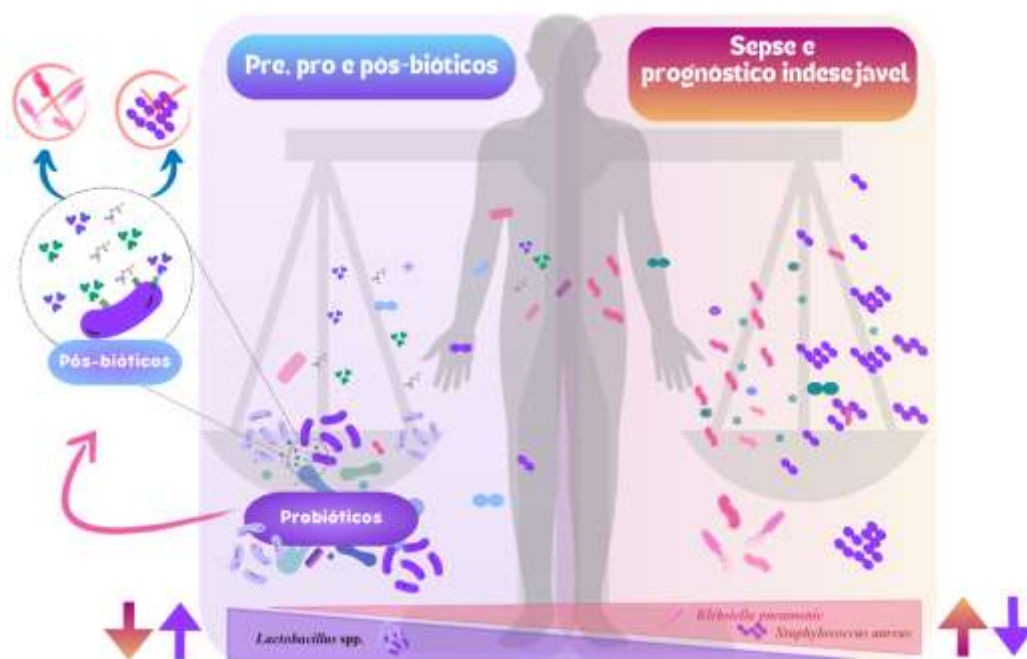
Legenda: O eixo Y indica a densidade óptica (600 nm), o eixo X indica a concentrações seriadas dos compostos analisados. O eixo X indica o sentido de concentração dos compostos testados, esses valores representam diluição seriada dos compostos analisados da maior a menor concentração. A linha pontilhada roxa representa a média global do controle positivo, com desvio em seu ponto inicial. As barras representam desvio-padrão das replicatas biológicas

6. Conclusão

As investigações acerca dos benefícios, composição e princípios ativos dos *Lactobacillus* spp. vem se expandindo progressivamente. Interessantemente, diferentes estudos sugerem os pró, pre e/ou pós-bióticos como uma promissora abordagem terapêutica. Por outro lado, estudos discutem que quando em baixas concentrações dos *Lactobacillus* spp. e consequentemente diminuição dos seus pós-bióticos, o crescimento patogênico progride. Este cenário de competição entre micro-organismos é consonante com as ideias de relações ecológicas desarmônicas, contexto que, desde as observações empíricas dos primeiros antibióticos, norteiam antigas e novas descobertas sobre abordagens antimicrobianas.

Neste estudo testamos a hipótese de que produtos metabólicos produzidos por *Lactobacillus* spp. podem reduzir ou impedir a colonização por bactérias patogênicas. Aqui, investigamos relações desarmônicas entre micro-organismos de modo a elucidar o efeito de pós-bióticos s de *Lactobacillus* spp. e do Butirato de Sódio sobre o crescimento das bactérias com elevado impacto em ambiente hospitalar, responsáveis por casos de Infecções Relacionadas a Assistência (IRA) e capazes de adquirir múltiplas resistências: *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*.

Figura 22 - Síntese da hipótese de Relações desarmônicas entre micro-organismos.



Legenda: A competição promovida pelo aumento dos *Lactobacillus* spp. desequilibra a população e colonização por bactérias patogênicas oportunistas. Em contrapartida, a diminuição de *Lactobacillus* spp. ou de seus produtos secretados, resulta no aumento da população de micro-organismos patogênicos

Fonte: Elaboração própria.

Os pós-bióticos testados neste estudo demonstraram atividade favorável e progressiva para a redução das populações de *K. Pneumoniae* e *S. aureus*. Os testes de CIM empregando concentrações variadas de pós-bióticos das espécies *L. reuteri*, *L. rhamnosus* e do ácido graxo de cadeia curta, NaBut, demonstraram que quando presentes em concentrações específicas no meio, promovem redução no crescimento de *K. pneumoniae* e *S. aureus*.

A partir dos resultados analisados pode-se afirmar que as concentrações de 50, 25 e 12.5% de *L. reuteri* e *L. rhamnosus* reduziram o crescimento de ambas as bactérias, quando comparado ao grupo controle (ausência de pós-bióticos). Já NaBut, foi capaz de reduzir o crescimento de *K. pneumoniae* nas concentrações de 50 mM, 25 mM, 12,5 mM e 6,25 mM, e também de *S. aureus* nas concentrações de 50 mM, 25 mM, 12,5 mM, 6,25 mM e 3,12 mM.

Diante da constante e crescente resistência aos antibióticos no atual cenário da saúde mundial, os dados deste estudo se tornam oportunos, pois primaram em investigar novas abordagens terapêuticas que atuem no combate a micro-organismos resistentes, ou que atuem como plano complementar em conjunto aos antibióticos, seja potencializando seus efeitos ou auxiliando na eliminação de patógenos.

Embora a literatura descreva efeitos benéficos dos probióticos e do NaBut, ainda são escassos dados com uso de pós-bióticos, o que torna este estudo pioneiro, no tocante ao tema e a escolha dos patógenos estudados. A elucidação do que compõe os pós-bióticos será uma ascensão nas pesquisas nesse campo, podendo verificar isoladamente cada componente e também em sinergismo, podendo potencializar seu efeito.

Por fim, os dados deste trabalho sugerem que os pós-bióticos podem se tornar uma abordagem coadjuvante terapêutica, com melhor economicidade e, especialmente, com um impacto de seleção de linhagens resistentes significativamente menor que os antimicrobianos atuais, visto que é uma relação desarmônica promovida por competição.

7. Referências

- ABDELHALIM, M. M. et al. In vitro antibacterial effect of probiotics against Carbapenamase-producing multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates, Cairo, Egypt. **Journal of the Egyptian Public Health Association**, v. 97, n. 1, p. 19, 10 out. 2022.
- ACTON, D. S. et al. Intestinal carriage of *Staphylococcus aureus*: how does its frequency compare with that of nasal carriage and what is its clinical impact? **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 28, n. 2, p. 115, 8 fev. 2009.
- 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.
- ANJOS, V. P. DOS; GÓES, R. E. DE. **Espectroscopia Raman/SERS aplicada ao monitoramento de antibióticos**. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba: [s.n.]. **Antibiotic resistance threats in the United States, 2019**. . Atlanta, Georgia: [s.n.].
- ARAÚJO, D. et al. Exploring the prevalence and antibiotic resistance profile of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* isolated from clinically ill companion animals from North of Portugal. **Research in Veterinary Science**, v. 159, p. 183–188, jun. 2023.
- BECATTINI, S.; TAUR, Y.; PAMER, E. G. Antibiotic-Induced Changes in the Intestinal Microbiota and Disease. **Trends in Molecular Medicine**, v. 22, n. 6, p. 458–478, jun. 2016.
- BEISNER, J. et al. Prebiotic Inulin and Sodium Butyrate Attenuate Obesity-Induced Intestinal Barrier Dysfunction by Induction of Antimicrobial Peptides. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 11 jun. 2021.
- BIER, D. et al. Suscetibilidade antimicrobiana de *Salmonella* spp e *Staphylococcus aureus* isolados de carnes bovinas comercializadas em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 23, 2022.
- BOYEN, F. et al. Coated fatty acids alter virulence properties of *Salmonella* Typhimurium and decrease intestinal colonization of pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 132, n. 3–4, p. 319–327, dez. 2008.
- BRAAT, H. et al. Dichotomy between *Lactobacillus rhamnosus* and *Klebsiella pneumoniae* on dendritic cell phenotype and function. **Journal of Molecular Medicine**, v. 82, n. 3, p. 197–205, 13 mar. 2004.
- BRANDÃO, F. A. et al. Histone deacetylases inhibitors effects on *Cryptococcus neoformans* major virulence phenotypes. **Virulence**, v. 6, n. 6, p. 618–630, 18 ago. 2015.
- CANTU-JUNGLES, T. M.; RASMUSSEN, H. E.; HAMAKER, B. R. Potential of Prebiotic Butyrogenic Fibers in Parkinson's Disease. **Frontiers in Neurology**, v. 10, 20 jun. 2019.
- CHALMERS, S. J.; WYLAM, M. E. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection and Treatment Options. Em: [s.l: s.n.]. p. 229–251.

CHEN, G. et al. Sodium Butyrate Inhibits Inflammation and Maintains Epithelium Barrier Integrity in a TNBS-induced Inflammatory Bowel Disease Mice Model. **eBioMedicine**, v. 30, p. 317–325, abr. 2018.

CHEUNG, G. Y. C.; BAE, J. S.; OTTO, M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 547–569, 31 dez. 2021.

CLEGG, S.; MURPHY, C. N. Epidemiology and Virulence of *Klebsiella pneumoniae*. Em: **Urinary Tract Infections**. Washington, DC, USA: ASM Press, 2016. p. 435–457.

COUTINHO LARANJEIRA, P. **Probióticos – Revisão Bibliográfica e Perspetivas Futuras**. Porto: Faculdade Ciências da Saúde Universidade Fernando Pessoa, 2020.

CUKROWSKA, B. et al. The Effectiveness of Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus casei* Strains in Children with Atopic Dermatitis and Cow's Milk Protein Allergy: A Multicenter, Randomized, Double Blind, Placebo Controlled Study. **Nutrients**, v. 13, n. 4, p. 1169, 1 abr. 2021.

CUSSOLIM, P. A. et al. Mecanismos de resistência do *Staphylococcus aureus* a antibióticos. **Revista Faculdades do Saber**, n. 8 3 1-8 4 3, 2021.

DORE, M. P. et al. *Lactobacillus reuteri* in the treatment of *Helicobacter pylori* infection. **Internal and Emergency Medicine**, v. 9, n. 6, p. 649–654, 1 set. 2014.

DOS SANTOS, T. T.; VARAVALLLO, M. A. A IMPORTÂNCIA DE PROBIÓTICOS PARA O CONTROLE E/OU REESTRUTURAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL. **Revista científica do ITPAC**, 2011.

ENRIGHT, M. C. et al. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 11, p. 7687–7692, 28 maio 2002.

ESCAMILLA, J.; LANE, M. A.; MAITIN, V. Cell-Free Supernatants from Probiotic *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus rhamnosus* GG Decrease Colon Cancer Cell Invasion In Vitro. **Nutrition and Cancer**, v. 64, n. 6, p. 871–878, ago. 2012.

FAN, Y. et al. Efficacy of herbal medicine (Gegen Qinlian Decoction) on ulcerative colitis. **Medicine**, v. 98, n. 52, p. e18512, dez. 2019.

FAVERO, C. et al. Postbiotics and Kidney Disease. **Toxins**, v. 14, n. 9, p. 623, 6 set. 2022.

FEDOROVA, T. V. et al. Antagonistic Activity of Lactic Acid Bacteria *Lactobacillus* spp. against Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 277–287, 1 maio 2018.

FERNANDES, M. S. M. **Atividade antimicrobiana e antibiofilme do sobrenadante de cepas de *Lactobacillus* cell-free sobre isolados de *Escherichia coli* farmacoresistentes**. Campus de Sobral: Universidade Federal do Ceará, 2019.

FORKUS, B. et al. Antimicrobial Probiotics Reduce Salmonella enterica in Turkey Gastrointestinal Tracts. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 40695, 17 jan. 2017.

FRANCHINI, F. P.; CÓSER, V. M. **Fatores de risco em pacientes com infecções hospitalares causadas por *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase.** [s.l: s.n.].

FURUSAWA, Y. et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. **Nature**, v. 504, n. 7480, p. 446–450, 19 dez. 2013.

GALVÃO, A. L. Z. et al. O alarmante aumento da resistência bacteriana a antimicrobianos. Seria o uso inapropriado destes um fator de influência? **Brazilian Journal of Health Review**, v. 6, n. 4, p. 18589–18602, 23 ago. 2023.

GOMEZ, A. Microbiome, health and illnesses: probiotics, prebiotics and synbiotics. **Biomédica**, v. vol.39 no.4, n. Bogotá Oct./Dec. 2019 Epub Dec 30, 2019, dez. 2019.

HIGHSMITH, A. K.; JARVIS, W. R. *Klebsiella pneumoniae*: Selected Virulence Factors that Contribute to Pathogenicity. **Infection Control**, v. 6, n. 2, p. 75–77, 2 fev. 1985.

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. 506–514, 10 ago. 2014.

HOWDEN, B. P. et al. Staphylococcus aureus host interactions and adaptation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 21, n. 6, p. 380–395, 27 jun. 2023.

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

IACG, INTERAGENCY COORDINATION GROUP ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE. **NO TIME TO WAIT: SECURING THE FUTURE FROM DRUG-RESISTANT INFECTIONS.** Apr. 2019.

IRAZOQUI, J. E. et al. Distinct Pathogenesis and Host Responses during Infection of *C. elegans* by *P. aeruginosa* and *S. aureus*. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 7, p. e1000982, 1 jul. 2010.

JONES, C. H. et al. Characterization and Sequence Analysis of Extended-Spectrum- β -Lactamase-Encoding Genes from *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* Isolates Collected during Tigecycline Phase 3 Clinical Trials. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 2, p. 465–475, fev. 2009.

KASNOWSKI, M. C. et al. FORMAÇÃO DE BIOFILME NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS E MÉTODOS DE VALIDAÇÃO DE SUPERFÍCIES. **REVISTA CIENTÍFICA ELETRÔNICA DE MEDICINA VETERINÁRIA**, 2010.

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.

KOBAYASHI, S. D.; DELEO, F. R. Staphylococcus aureus Protein A Promotes Immune Suppression. **mBio**, v. 4, n. 5, nov. 2013.

KOOHESTANI, M. et al. Efeitos do sobrenadante livre de células de Lactobacillus acidophilus LA5 e Lactobacillus casei 431 contra a forma planctônica e biofilme de Staphylococcus aureus. **Forum de Medicina Veterinária**, v. 9, p. 301–306, 2018.

LARSSON, D. G. J.; FLACH, C.-F. Antibiotic resistance in the environment. **Nature Reviews Microbiology**, v. 20, n. 5, p. 257–269, 4 maio 2022.

LE, B.; YANG, S. H. Efficacy of Lactobacillus plantarum in prevention of inflammatory bowel disease. **Toxicology Reports**, v. 5, p. 314–317, 2018.

LEE, A. S. et al. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 18033, 31 maio 2018.

LIANG, B.; XING, D. As Perspectivas Atuais e Futuras dos Pós-bióticos. **Probióticos e Proteínas Antimicrobianas**, p. 1–18, 2023.

LIWINSKI, T.; ZHENG, D.; ELINAV, E. The microbiome and cytosolic innate immune receptors. **Immunological Reviews**, v. 297, n. 1, p. 207–224, 13 set. 2020.

LOUREIRO, R. J. et al. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, v. 34, n. 1, p. 77–84, jan. 2016.

MOGNA, L. et al. In Vitro Inhibition of Klebsiella pneumoniae by Lactobacillus delbrueckii Subsp. delbrueckii LDD01 (DSM 22106). **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 50, n. Supplement 2, p. S136–S139, nov. 2016.

MOHAMMEDSAEED, W. et al. Lactobacillus rhamnosus GG Inhibits the Toxic Effects of Staphylococcus aureus on Epidermal Keratinocytes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 18, p. 5773–5781, 15 set. 2014.

MORAES, M. C. C. et al. Avaliação do efeito de cepas probióticas em biofilme de S. aureus sobre discos de titânio com superfície tratada. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 48, 2019.

MOREJÓN GARCÍA, M. Beta-lactamases de espectro estendido. **Revista Cubana de Medicina**, p. 272–280., 2013.

MU, Q.; TAVELLA, V. J.; LUO, X. M. Role of Lactobacillus reuteri in Human Health and Diseases. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 19 abr. 2018.

MUSA, M. S. Estudo dos Efeitos Inibitórios do Lactobacillus Plantarum Contra a Resistência do Staphylococcus Aureus à Meticilina. **Journal of Pharmaceutical Negative Results**, p. 1755–1764, 2022.

NAAS, H. T. et al. Occurrence, characterization, and antibiogram of Staphylococcus aureus in meat, meat products, and some seafood from Libyan retail markets. **Veterinary World**, v. 12, n. 6, p. 925–931, 29 jun. 2019.

NAUFEL, M. F. et al. The brain-gut-microbiota axis in the treatment of neurologic and psychiatric disorders. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 81, n. 07, p. 670–684, 4 jul. 2023.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772–776, set. 2002.

NOGUEIRA, J. O. S. et al. Staphylococcus aureus resistente em unidade de terapia intensiva. **Research, Society and Development**, v. 12, n. 6, p. e7312642006, 8 jun. 2023.

O'HARA, A. M.; SHANAHAN, F. The gut flora as a forgotten organ. **EMBO reports**, v. 7, n. 7, p. 688–693, jul. 2006.

OLIVEIRA, M. N. DE et al. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 1, p. 1–21, mar. 2002.

OLIVEIRA, E. B. DE J.; CAVALCANTE, L. B. DA S.; RIBEIRO, D. L. R. Atividade antimicrobiana do allium sativum em combate a cândida albicans e staphylococcus aureus: uma revisão de literatura / antimicrobial activity of allium sativum against candida albicans and staphylococcus aureus: a literature review. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 1, p. 9205–9231, 2021.

PACZOSA, M. K.; MECSAS, J. Klebsiella pneumoniae: Going on the Offense with a Strong Defense. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 3, p. 629–661, set. 2016.

PANIÁGUA, A. L. et al. Inhibitory effects of Lactobacillus casei Shirota against both Candida auris and Candida spp. isolates that cause vulvovaginal candidiasis and are resistant to antifungals. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 21, n. 1, p. 237, 23 dez. 2021.

PETROVA, M. I. et al. Lactobacillus species as biomarkers and agents that can promote various aspects of vaginal health. **Frontiers in Physiology**, v. 6, 25 mar. 2015.

REHMAN, S. A parallel and silent emerging pandemic: Antimicrobial resistance (AMR) amid COVID-19 pandemic. **Journal of Infection and Public Health**, v. 16, n. 4, p. 611–617, abr. 2023.

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

SANDERS, M. E. et al. Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 16, n. 10, p. 605–616, 11 out. 2019.

SANTOS, A. L. DOS et al. Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413–423, dez. 2007.

SANTOS, T. R. A. et al. Consumo de medicamentos por idosos, Goiânia, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 47, n. 1, p. 94–103, fev. 2013.

SUN, Q. et al. Sodium Butyrate Alleviates Intestinal Inflammation in Mice with Necrotizing Enterocolitis. **Mediators of Inflammation**, v. 2021, p. 1–12, 12 out. 2021.

UYMAZ, B.; AKKOÇ, N.; AKÇELİK, M. Partial characterization of bacteriocins produced by two *Lactobacillus* strains with probiotic properties. **Acta Biologica Hungarica**, v. 62, n. 1, p. 95–105, mar. 2011.

VAREILLE-DELARBRE, M. et al. Immunomodulatory Effects of *Lactobacillus plantarum* on Inflammatory Response Induced by *Klebsiella pneumoniae*. **Infection and Immunity**, v. 87, n. 11, nov. 2019.

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

WAGNER, R.; JOHNSON, S. J. Probiotic *Lactobacillus* and estrogen effects on vaginal epithelial gene expression responses to *Candida albicans*. **Journal of Biomedical Science**, v. 19, n. 1, p. 58, 2012.

WANG, G. et al. The Characteristic of Virulence, Biofilm and Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae*. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 17, p. 6278, 28 ago. 2020.

WYRES, K. L.; LAM, M. M. C.; HOLT, K. E. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 6, p. 344–359, 13 jun. 2020.

XI, Y. et al. Inhibitory effect of sodium butyrate on colorectal cancer cells and construction of the related molecular network. **BMC Cancer**, v. 21, n. 1, p. 127, 6 dez. 2021.

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.

ZHANG, S. et al. Phenotypic and Genotypic Characterization of *Klebsiella pneumoniae* Isolated From Retail Foods in China. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 1 mar. 2018.

ZHOU, D. et al. Sodium butyrate attenuates high-fat diet-induced steatohepatitis in mice by improving gut microbiota and gastrointestinal barrier. **World Journal of Gastroenterology**, v. 23, n. 1, p. 60, 2017.

ZHU, J. et al. Virulence Factors in Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 8 abr. 2021.

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