

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta Dissertação será disponibilizado somente a partir de 19/06/2023.

**Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

**Desenvolvimento de filmes orodispersíveis
potencialmente probióticos para promoção da saúde
oral**

Virgínia Barreto Lordello

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição para obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Ciência dos Alimentos
Orientadora: Prof. Dra. Daniela Cardoso Umbelino
Cavallini
Coorientadora: Prof. Dra. Carla Raquel Fontana

Araraquara
2019

Desenvolvimento de filmes orodispersíveis potencialmente probióticos para promoção da saúde oral

Virgínia Barreto Lordello

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição para obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Ciência dos Alimentos
Orientadora: Prof. Dra. Daniela Cardoso Umbelino Cavallini
Coorientadora: Prof. Dra. Carla Raquel Fontana

Araraquara
2019

L866d

Lordello, Virgínia Barreto.

Desenvolvimento de filmes orodispersíveis potencialmente probióticos para promoção da saúde oral / Virgínia Barreto Lordello. – Araraquara, 2019.
79 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição. Área de Concentração em Ciências dos Alimentos.

Orientadora: Daniela Cardoso Umbelino Cavallini.
Coorientadora: Carla Raquel Fontana.

1. Probióticos. 2. Atividade anti-Candida. 3. Biofilmes. 4. Filmes orodispersíveis. 5. *Candida albicans* ATCC 90028. 6. *Enterococcus faecium* CRL 183. I. Cavallini, Daniela Cardoso Umbelino, orient. II. Fontana, Carla Raquel, coorient. III. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

CAPES: 33004030055P6
Esta ficha não pode ser modificada



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Desenvolvimento de filmes orodispersíveis potencialmente probióticos para promoção da saúde oral

AUTORA: VIRGINIA BARRETO LORDELLO

ORIENTADORA: DANIELA CARDOSO UMBELINO CAVALLINI

COORDINADORA: CARLA RAQUEL FONTANA MENDONÇA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em ALIMENTOS E NUTRIÇÃO, área: Ciência dos Alimentos pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. DANIELA CARDOSO UMBELINO CAVALLINI

Departamento de Alimentos e Nutrição / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara - UNESP

Dr. JULIANA CABRINI CARMELLO

Departamento de Materiais Odontológicos e Prótese / Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araraquara da UNESP

Prof. Dr. MARLUS CHORILLI

Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara - UNESP

Araraquara, 19 de junho de 2019

AGRADECIMENTOS:

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (Capes) – Código de Financiamento 001.

À Profa. Dra. Daniela Cardoso Umbelino Cavallini, por todo conhecimento compartilhado, pelas horas dedicadas a mim e ao meu trabalho, por toda paciência, confiança e carinho.

À Prof. Dra. Carla Raquel Fontana por ter aceitado ser minha coorientadora, por todos os ensinamentos e por sua disponibilidade em me aceitar em seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Marlus Chorilli por ter aberto as portas do laboratório de farmacotécnica e pelos seus direcionamentos. À Andreia e aos alunos Amanda, Bruno e Franciele pela colaboração com a realização dos experimentos.

Ao Prof. Marcelo Orlandi e ao técnico Diego Tita do laboratório de microscopia MEV-FEG do IQ-UNESP.

Ao Departamento de Alimentos e Nutrição da FCFAR-UNESP e aos docentes, pela oportunidade, pelo aprendizado e experiência concedidos durante o curso de mestrado.

Às empresas, Gelita, Labonathus, Biovital, Firmenich, e TIC GUMS, que colaboraram com o fornecimento de matérias-primas para a realização da pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa do mestrado.

Aos membros da banca examinadora pelas correções e contribuição com esse trabalho.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação e da Biblioteca da FCFAR-UNESP.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS PESSOAIS:

Agradeço primeiramente a Deus pela vida e por Sua providência sempre fiel.

À minha família por ter superado comigo todos os obstáculos que apareceram em nosso caminho ao longo dos últimos dois anos e por todo suporte para que eu me dedicasse à pesquisa.

Aos técnicos do laboratório Adriano, Roseli e Josiane, por todos os cafezinhos que tomamos juntos nesses dois anos, por todo auxílio e ensinamentos.

Aos colegas de laboratório: Izabela, Juliana, Giovana, Eliane, Lucas, Laís, Malu e William pelo convívio e troca de experiências.

Em especial, gostaria de agradecer à Laura e à Sarah pelo encorajamento em momentos de desânimo, auxílio no planejamento de experimentos e esclarecimento de dúvidas.

À Natália Cordano pela amizade que construímos graças ao mestrado e pelo suporte em tantos momentos, seja de perto ou de longe.

A todos que foram ombro amigo durante esses dois anos.

Dedico essa dissertação de mestrado à minha avó, Maria Aparecida Rossi Barreto, que é um grande exemplo para mim e sempre me motivou a ser uma boa profissional.

"Pode-se tirar tudo de um homem exceto uma coisa:
a última das liberdades humanas – escolher a própria atitude
em qualquer circunstância, escolher o próprio caminho."

Viktor Frankl

RESUMO

Os microrganismos probióticos associados a produtos alimentícios já são amplamente utilizados para a manutenção da saúde e redução do risco de certas doenças. Nesse contexto, diversos estudos mostram que cepas probióticas específicas têm grande potencial de manutenção e melhora da saúde oral, apresentando atividade anticariogênica, redução da halitose e prevenção de infecções oportunistas, como a candidose, frequentemente presente em indivíduos imunocomprometidos. Essas condições patogênicas apresentadas estão relacionadas à formação e estabelecimento de biofilmes na cavidade oral. As infecções provenientes de biofilmes são duradouras, altamente resistentes à farmacoterapia e de difícil eliminação.

Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi obter filmes orodispersíveis (ODF) contendo cepa probiótica *Enterococcus faecium* CRL 183, avaliando sua capacidade de inibir a formação e/ou maturação de biofilme de *Candida albicans in vitro*. Essa cepa foi selecionada devido as suas características de cultivo, informações disponíveis sobre efeito probiótico, segurança e caráter inovador, pois não há na literatura informações sobre a atividade antifúngica dessa cepa na cavidade oral.

A segurança da cepa probiótica foi avaliada através do teste susceptibilidade a antimicrobianos. Para testar a capacidade de inibição de biofilmes de *C. albicans in vitro* foram formados biofilmes polimicrobianos (*C. albicans* + *E. faecium*), em diferentes proporções de fungo: probiótico (1:1; 1:10; 1:100), a serem avaliados durante os períodos de formação (24 horas) e maturação (48 horas) do biofilme. A cepa probiótica foi incorporada em um filme orodispersível (ODF) para avaliar sua resistência durante o processamento e armazenamento e efeito inibitório contra os biofilmes de *C. albicans*. Os resultados evidenciaram que o microrganismo *E. faecium* CRL 183 foi capaz de se estabelecer em um biofilme polimicrobiano com *C. albicans* ATCC 90028 sem perder sua viabilidade celular, ao passo que antagonizou significativamente a formação (até 99,9% de redução em 24 horas) e maturação (até 99% de redução em 48 horas) do biofilme de *C. albicans*. Os filmes orodispersíveis com e sem probióticos (PF e CF, respectivamente) apresentaram aspecto e textura uniformes, pH neutro, baixa atividade de água e não apresentaram contaminação por bolores, leveduras ou coliformes totais durante o armazenamento. O probiótico resistiu à produção do ODF, apresentando viabilidade elevada ($> 9 \log_{10}$ UFC/g), até 90 dias de armazenamento à temperatura ambiente. A incorporação do probiótico na matriz polimérica do ODF não alterou significativamente as propriedades mecânicas, o tempo de desintegração *in vitro*, o intumescimento, a atividade de água e a mucoadesividade em relação a CF. Entretanto o probiótico aumentou o parâmetro de cor amarelo (+b*), o teor residual de umidade, a espessura e a permeabilidade ao vapor d'água dos filmes. O filme probiótico (PF) foi capaz de reduzir em 68,99% (0,52 log) a formação e em 91,24% (1,15 log) a maturação do biofilme de *C. albicans* em comparação aos biofilmes estimulados com o filme orodispersível controle (CF). Dessa forma, conclui-se que os filmes orodispersíveis são uma forma eficiente de veicular o probiótico *E. faecium* CRL 183, com potencial de prevenir o estabelecimento de infecções causadas por *C. albicans* na cavidade oral.

Palavras-chave: Probióticos, atividade anti-*Candida*, Biofilmes, Filmes orodispersíveis, *Candida albicans* ATCC 90028, *Enterococcus faecium* CRL 183.

ABSTRACT

Probiotic microorganisms associated with food are already widely used to maintain health and reduce risk of certain diseases. In this context, several studies show that certain probiotic strains have great potential for maintenance and improvement of oral health, presenting anticariogenic activity, reduction of halitosis and prevention of opportunistic infections, such as candidiasis, often present in immunocompromised individuals. These pathogenic conditions are related to formation and establishment of biofilms in the oral cavity. Infections caused by biofilms are long-lasting, highly resistant to pharmacotherapy and difficult to eliminate.

Thus, the objective of the present study is to obtain orodispersible films (ODF) containing *Enterococcus faecium* CRL 183, evaluating its capacity of inhibiting the formation and / or maturation of *Candida albicans* biofilms in vitro. This strain was selected due to its cultivation characteristics, available information on probiotic effect and safety and innovative character, as there is no information on the antifungal activity of this strain in the oral cavity. The safety of the probiotic strain was evaluated by antimicrobial susceptibility test. In order to test the ability to inhibit the formation of *C. albicans* biofilms in vitro, combined polymicrobial biofilms (*C. albicans* + *E. faecium*) with different proportions of opportunistic pathogens: probiotic were formed (1: 1, 1:10, 1: 100), during the formation (24 hours) and maturation (48 hours) periods of the biofilm. The probiotic strain was incorporated into an orodispersible film (ODF) to evaluate its resistance during processing and storage and inhibitory effect against *C. albicans* biofilms.

The results showed that *E. faecium* CRL 183 microorganism was able to establish itself in *C. albicans* ATCC 90028 polymicrobial biofilm without losing its cellular viability. It significantly antagonized the formation (up to 99.9% reduction in 24 hours) and maturation (up to 99% reduction in 48 hours) of *C. albicans* biofilm. The orodispersible films with and without probiotics (PF and CF, respectively) presented uniform appearance and texture, neutral pH, low water activity and did not show contamination by molds, yeasts or total coliforms during storage. The probiotic resisted to the ODF production, presenting high viability ($> 9 \log_{10}$ CFU / g), up to 90 days of storage at room temperature. The incorporation of the probiotic in the polymer matrix of ODF did not significantly alter the mechanical properties, in vitro disintegration time, swelling, water activity and mucoadhesiveness in relation to CF. However, the probiotic increased the yellow color parameter (+ b *), the residual moisture content, the thickness and the water vapor permeability of the films. The probiotic film (PF) was able to reduce the formation of *C. albicans* biofilm in 68.99% (0.52 log) formation and in 91.24% (1.15 log) the biofilm maturation compared to the biofilms stimulated with orodispersible control film (CF). Thus, it is concluded that orodispersible films are an efficient way of transporting the probiotic *E. faecium* CRL 183, with potential to prevent the establishment of infections caused by *C. albicans* in the oral cavity.

Keywords: Probiotics, anti-*Candida* activity, Biofilms, Orodispersible films, *Candida albicans* ATCC 90028, *Enterococcus faecium* CRL 183.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	5
Objetivo Geral.....	15
Capítulo 1. Probiotic <i>Enterococcus faecium</i> CRL 183 inhibits <i>Candida albicans</i> <i>in vitro</i>	Erro! Indicador não definido.
Capítulo 2. Development of orodispersible films loaded with probiotic <i>E. faecium</i> CRL 183 for oral candidiasis prevention.....	Erro! Indicador não definido.
CONSIDERAÇÕES FINAIS	16
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17

INTRODUÇÃO

Probióticos são definidos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (1,2).

Tais microrganismos devem ser preferencialmente de origem humana, dentre os quais destacam-se *Bifidobacterium* spp, as bactérias produtoras de ácido lático como os gêneros *Lactobacillus* spp. e, em menor escala, *Enterococcus* spp. (2–4). Também são representantes dessa classe leveduras como *Saccharomyces* spp. (3,4).

Probióticos devem ainda apresentar resistência às condições adversas do trato gastrointestinal (especialmente se os efeitos esperados forem sistêmicos), modular positivamente os sistemas fisiológicos do paciente, ser inócuos e não devem transmitir genes de resistência antimicrobiana (2,3).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) recentemente revisou os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos (Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 241, de 26 de julho de 2018), estabelecendo que a identificação da linhagem do microrganismo deve ser inequívoca contemplando a nomenclatura binomial, identificação fenotípica e genotípica, origem e depósito em coleção de cultura internacionalmente conhecida (5). Além disso, a comprovação da segurança do probiótico deve ser demonstrada através de estudos científicos e documentos técnicos que assegurem o histórico de uso seguro, ausência de registros de eventos adversos, ausência de fatores de virulência e patogenicidade, ausência de resistência potencialmente transferível a antibióticos relevantes para a saúde humana; e susceptibilidade a, pelo menos, dois antibióticos (5). A resolução ainda determina que os benefícios à saúde devem ser comprovados por meio de estudos que envolvam um grupo representativo da população, considerando a quantidade mínima de cepa probiótica sugerida para obtenção desse benefício (5).

Está bem estabelecido na literatura que probióticos têm um impacto positivo no funcionamento do trato gastrointestinal e auxiliam no tratamento ou redução de risco de diversas doenças como: diarreia decorrente do uso de antibióticos, síndromes metabólicas, vaginites, doenças respiratórias, hipercolesterolemia e

doenças inflamatórias intestinais (6,7).

Em relação à saúde oral, estudos têm evidenciado que o consumo de certas cepas de microrganismos probióticos pode diminuir a halitose, a incidência de cáries em crianças e de doença periodontal, incluindo sangramento causado por gengivite, além de combater infecções orais por *Candida* spp. (8,9).

A maioria das doenças da cavidade oral inicia-se com a formação dos biofilmes microbianos que revestem os dentes, popularmente conhecidos como placa dentária. Os microrganismos presentes nesses biofilmes metabolizam carboidratos da dieta e podem promover a desmineralização e destruição localizada de tecidos dentários, inicialmente na superfície do esmalte, mas podendo atingir a dentina no caso de cáries mais profundas e até comprometer a polpa dental (9,10).

Para que doenças orais ocorram, a interação de três fatores é indispensável: o hospedeiro (dentes, saliva e sistema imune), a constituição da microbiota oral residente e a dieta (tipo e frequência) (10).

Sabe-se que biofilmes são ecossistemas microbianos complexos caracterizados por células ligadas entre si e a um substrato, ou à superfícies bióticas e abióticas envoltas por uma matriz de polímero extracelular (Exopolissacarídeos - EPS) (11). O EPS confere aos microrganismos proteção contra o sistema imune e a agentes antimicrobianos, promove o sequestro de nutrientes do meio, facilita a dispersão para outras regiões não infectadas, entre outras vantagens (12–15).

Na ausência de higiene oral um biofilme é capaz de estar completamente formado em um período de apenas quatro horas após as refeições e, mesmo com a prática da escovação dental diária e o uso do fio dental, não ocorre a eliminação completa desses biofilmes que, além de estarem envolvidos na gênese da cárie dentária, podem também atuar na periodontite e candidíase oral (8)

Diferentes microrganismos estão envolvidos no desenvolvimento de doenças que afetam a saúde bucal, entre eles merecem destaque: *Streptococcus mutans*, *Candida albicans* e *Lactobacillus* spp. (16–20).

Diversas cepas probióticas apresentam capacidade de se estabelecer em biofilmes e de reduzir a população de patógenos altamente prevalentes na cavidade oral como *Actinomyces viscosus*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Streptococcus mutans*. (4,7). Apesar de algumas espécies de *Lactobacillus* spp. estarem presentes em lesões de cárie (17), o consumo de produtos contendo cepas

específicas, como *Lactobacillus rhamnosus* GG, foi relacionado à diminuição na incidência de cáries, bem como, redução na população de *Streptococcus mutans* em crianças, comparado a um grupo controle que não ingeriu o produto contendo essa cepa probiótica (21). Samot e Badet (2013) investigaram a ação probiótica de 66 espécies de lactobacilos, e observaram que todas essas espécies foram capazes de inibir o crescimento de *S. mutans* e *A. viscosus*, e a maioria desses lactobacilos foram capazes de antagonizar *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis*, duas cepas presentes em doenças periodontais (22).

Além do gênero *Lactobacillus* spp., as cepas probióticas *Enterococcus faecium* WB2000, *Bifidobacterium adolescentis* SPM1005 e *Bifidobacterium* BB12 foram efetivas na inibição da formação e crescimento de biofilmes (23).

Os mecanismos pelos quais os microrganismos probióticos atuam na melhora ou manutenção da saúde oral incluem redução de microrganismos patogênicos formadores de biofilmes, em função da produção de substâncias com propriedade antimicrobiana (peróxido de hidrogênio e bacteriocinas), proteases, e por competição direta pelos nutrientes disponíveis e sítios de adesão na cavidade oral (3). Pujia e colaboradores (2017) sugeriram que os probióticos também afetam os patógenos por serem capazes de modular as ações locais e sistêmicas do sistema imune, neutralizar fatores de virulência e interferir nos sistemas de sinalização bacteriana (*quórum sensing*) (9).

O fungo oportunista da pele e mucosa humana, *Candida albicans*, está presente na cavidade oral de mais de 75% da população (19). Altamente associado a infecções hospitalares provenientes de sondas e cateteres, é o quarto microrganismo mais isolado da corrente sanguínea nesses casos (24).

Devido a mudanças ambientais, alterações na microbiota e competência do sistema imunológico do hospedeiro, a espécie *C. albicans* pode se tornar patogênica, especialmente em pacientes em quimioterapia, transplantados, soropositivos, idosos, pacientes com debilidades motoras, usuários de prótese totais ou parciais e recém-nascidos de baixo peso (19, 25–27).

As principais doenças causadas por *C. albicans* em seres humanos são as infecções superficiais, como a candidíase oral (muito prevalente em imunocomprometidos) ou vaginal, que acomete 75% das mulheres ao menos uma vez na vida (19). Os pacientes imunossuprimidos correm o risco dessas infecções

superficiais tornarem-se invasivas, podendo atingir a corrente sanguínea (candidemia) ou órgãos vitais como rins, fígado e coração (27).

C. albicans é considerada a espécie mais prevalente e virulenta do gênero, pois entre os seus principais fatores de virulência, pode-se destacar o polimorfismo entre leveduras e hifas, que é um mecanismo de evasão do sistema imune inato por dificultar a fagocitose, bem como a formação de biofilmes e produção de toxinas e enzimas hidrolíticas (25, 28, 29).

Como a maioria das infecções causadas por biofilmes, as infecções por *C. albicans* são duradouras, de difícil eliminação e com elevada resistência à farmacoterapia. Os biofilmes de *C. albicans* geralmente apresentam resistência aos principais antifúngicos existentes como: anfotericina B, fluconazol, voriconazol e nistatina (15).

Tanto os fungos quanto os humanos são eucariontes e, no nível molecular, suas células são semelhantes. Isso torna mais difícil encontrar ou projetar drogas que atinjam fungos sem afetar as células humanas (30). Dessa forma, é urgente a busca por alternativas para o tratamento e prevenção de doenças, em especial fúngicas, causadas por biofilmes.

Como uma dessas alternativas, a literatura demonstra que muitas cepas potencialmente ou comprovadamente probióticas apresentam atividade anti-*Candida*. Em uma revisão de literatura conduzida em 2016 demonstrou-se através de estudos *in vivo* e *in vitro*, que cepas probióticas como *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum*, *Saccharomyces boulardii*, *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus salivarius*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, bem como vários isolados clínicos, teriam atividades inibitórias contra *Candida* spp. (4).

Um estudo duplo-cego randomizado avaliou o efeito de uma mistura de probióticos - *Lactobacillus rhamnosus* HS111, *Lactobacillus acidophilus* HS101 e *Bifidobacterium bifidum* – na forma de cápsulas liofilizadas, no desenvolvimento de candidíase oral assintomática em pacientes com prótese total (dentadura). Após cinco semanas de tratamento, a taxa de detecção de *Candida* spp. foi de 92% no grupo placebo e 16,7% no grupo tratado com probióticos, evidenciando a sua capacidade de reduzir a colonização da cavidade oral por esse microrganismo (31).

Matsubara e colaboradores (2016) observaram que suspensões de *L. rhamnosus*, *L. casei* e *L. acidophilus* reduziram significativamente a formação de biofilmes de *C. albicans* SC5314 em 32, 59 e 56,3%, respectivamente. Quando biofilmes maduros (48 horas) foram estimulados com as mesmas suspensões probióticas, a redução dos biofilmes foi de 61,8% (*L. rhamnosus*), 54,7% (*L. casei*) e de 34,2% (*L. acidophilus*) (27). Ao estimular os biofilmes de *C. albicans* com o sobrenadante filtrado dessas culturas de lactobacilos, a redução foi menos efetiva na formação, e não houve redução na maturação dos biofilmes. Esse resultado demonstra que a ação inibitória dessas cepas sobre *C. albicans* não é mediada unicamente pela produção de metabólitos (27).

Mailänder-Sánchez e colaboradores (2017) observaram que a cepa probiótica *Lactobacillus rhamnosus* GG impediu a adesão, invasão, formação de hifas (prevenindo danos epiteliais), depleção de glicose e da síntese de ergosterol de *C. albicans* (32).

Vilela e colaboradores (2015) relataram redução de até 57,5% da contagem de *C. albicans* em biofilmes estimulados com culturas de *L. acidophilus* ATCC 4356 e redução de 45,10% em biofilmes estimulados com sobrenadante filtrados dessa cultura probiótica (33).

Ambos os estímulos (suspensão de células probióticas ou filtrado) foram eficientes na supressão da formação de hifas. Nesse estudo, *Galleria mellonella* foi utilizada como modelo de candidíase experimental e o tratamento e a profilaxia com células de *L. acidophilus* ou com seus metabólitos aumentou consideravelmente a sobrevivência desse inseto (33).

Ribeiro e colaboradores (2017) observaram efeito semelhante na interação de *C. albicans* com células de *L. rhamnosus*: diminuição de 52,2 % na quantificação de biofilme em UFC/ mL e redução de 48% na atividade metabólica. O sobrenadante filtrado de *L. rhamnosus* diminuiu o crescimento de *C. albicans* em 39,4% e atividade metabólica em 61% (34). *L. rhamnosus* também promoveu a regulação negativa de diversos genes associados a fatores de virulência de *C. albicans* como ALS3 e HWP1 (relacionados à adesão e filamentação) e de BCR1 e CPH1 (genes reguladores do processo de transcrição celular) (34). *L. rhamnosus* foi capaz de proteger *G. mellonella* de candidíase experimental (34).

Sabe-se também que não apenas os microrganismos probióticos podem competir com *C. albicans* influenciando sua viabilidade e patogenicidade. Há na literatura diversos estudos que avaliam a interação entre esse fungo e bactérias patogênicas como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus gordonii*, *Actinomyces viscosus*, espécies de *Fusobacterium* spp., *Enterococcus* spp., *Escherichia* spp. e até mesmo *Pseudomonas aeruginosa* em casos de fibrose cística (29, 35).

Dentre esses microrganismos, a relação entre os gêneros *Enterococcus* spp. e *Candida* spp. mostrou-se particularmente interessante, pois a literatura mostra que o fungo favorece a bactéria, porém essa relação não é mutuamente benéfica. Dois estudos conduzidos por Mason e colaboradores (2012) demonstraram que *C. albicans* SC5314 promoveu aumento e persistência da colonização gástrica e entérica de *Enterococcus* spp. ao passo que antagonizou outras espécies de bactérias láticas como, por exemplo, *Lactobacillus* spp., durante a recuperação da microbiota após tratamento com antibiótico cefoperazona (36,37).

Apesar do mecanismo envolvido não ter sido elucidado, os autores observaram efeito promotor semelhante em relação a populações de *Bacteroidetes* e sugerem que *C. albicans* poderia auxiliar a sua adesão e fixação ao ceco; que glucanos da levedura poderiam ser fonte potencial de alimento para essas bactérias, ou ainda, *C. albicans* poderia suprimir outras bactérias que antagonizam *Bacteroidetes* (37). Por outro lado, *Enterococcus* spp. diminui a patogenicidade de *C. albicans* através da ação de proteases, peptídeos e bacteriocinas. Pesquisadores identificaram a ação de duas proteases (peptídeos de ativação da biossíntese de gelatinase - GBAP) ativadoras do sistema regulador da virulência de *Enterococcus* spp., que ao serem secretadas por essa bactéria, impediram o polimorfismo de *C. albicans* (38). O polimorfismo é um dos principais fatores de virulência associados a esse fungo e a formação de hifas está intrinsecamente ligada à formação de biofilmes e à invasão das células hospedeiras (19,25,38).

Cruz e colaboradores (2013) demonstraram ainda que *Caenorhabditis elegans*, modelo de estudo de infecções polimicrobianas, apresentou uma mortalidade ocasionada por *C. albicans* menor quando era co-inoculado por

Enterococcus spp. Sendo a taxa de sobrevivência do nematódeo dose-dependente, quanto maior o número de colônias de *Enterococcus* spp. inoculadas, maior a proteção contra a patogenicidade de *C. albicans* (38). Este estudo determinou ainda que a patogenicidade de ambos os microrganismos era atenuada durante a infecção polimicrobiana em *C. elegans*. O mesmo efeito foi observado ao tratar *C. elegans*, já contaminado por *C. albicans*, com o sobrenadante filtrado e esterilizado de um inóculo de *Enterococcus faecalis*, constatando-se redução considerável da formação de hifas e, conseqüentemente, da patogênese do fungo (38). Shekh e Roy (2012) caracterizaram e purificaram parcialmente uma proteína anti-candida (ACP) produzida por *Enterococcus faecalis* que apresentou atividade de amplo espectro contra oito cepas de *C. albicans* multirresistentes (30).

Em um estudo de 2017 foi descrita a ação da bacteriocina EntV, codificada por um gene que está presente em todas as cepas de *E. faecalis* sequenciadas até o momento, o gene Ef1097 (39). Essa enterocina sozinha, bem como seu análogo sintético, foi suficiente para impedir o polimorfismo de *C. albicans* SC5314 e a formação de biofilmes em diferentes substratos e condições experimentais. Biofilmes de *C. albicans* pré-formados (24 horas/ ~30 µm de espessura) foram tratados com EntV e sofreram grande perturbação, com redução de sua espessura para ~15 µm. Os biofilmes que não foram tratados com EntV aumentaram sua espessura para > 50 µm (39). O peptídeo também protegeu macrófagos aumentando sua atividade antifúngica, reduziu a invasão epitelial, a inflamação e a carga fúngica em um modelo murino de candidíase orofaríngea (39).

Bachtar e colaboradores (2016) observaram que *E. faecalis* cps2 (um isolado clínico não encapsulado) e *E. faecalis* ATCC 29212, bem como os metabólitos produzidos por essas cepas, não inibiram a formação de biofilmes de *C. albicans* ATCC 10231 e promoveram a expressão de genes associados à formação de biofilme. No entanto, *E. faecalis* cps2 e *E. faecalis* ATCC 29212 reduziram significativamente (>50%) a maturação desses biofilmes (40). Esses resultados foram confirmados pela regulação negativa promovida pelas cepas de *E. faecalis* e seus metabólitos sobre genes de adesão ALS1 e ALS3 e sobre EFB1, gene utilizado para medir quantitativamente os efeitos prejudiciais de agentes antifúngicos contra biofilmes de candida maduros (40).

É importante salientar que em nenhum dos estudos citados (36-40) que avaliaram o potencial anti-*Candida* de *Enterococcus* spp., a cepa bacteriana utilizada foi descrita como sendo inócua, muito menos tendo alegação probiótica. Sabe-se, também que existe muita preocupação em relação a *Enterococcus* spp. devido à sua alta incidência em infecções nosocomiais, e alta capacidade de tornar-se resistente a antibióticos e transferir genes de resistência, em especial à vancomicina, para outros patógenos (41). Provavelmente por essa razão, nesses estudos foram explorados majoritariamente a ação de metabólitos, peptídeos e bacteriocinas ao passo que a interação célula – célula não foi considerada viável.

Como visto anteriormente, a ação probiótica também pode ser mediada pela secreção de metabólitos, porém a competição célula-célula por sítios de adesão e nutrientes pode ser um potencializador do efeito anti-*Candida* (9,27,31,33,34). Dessa forma, seria interessante avaliar se o efeito dos metabólitos produzidos *Enterococcus* spp. seria também potencializado por essa competição direta, uma vez que algumas cepas desse gênero são consideradas seguras e probióticas (2, 41).

A cepa probiótica *Enterococcus faecium* CRL 183 foi isolada do queijo Tafi, tradicional no Vale do Tafi, noroeste da Argentina e tem documentada a sua nomenclatura binomial, identificação genotípica, histórico de uso seguro, ausência de registros de eventos adversos, ausência de fatores de virulência, patogenicidade e resistência antimicrobiana (42).

Vários benefícios sistêmicos promovidos por essa cepa probiótica estão documentados, como modulação do sistema imunológico e da microbiota intestinal, redução dos sintomas relacionados à colite ulcerativa (43), regulação do perfil lipídico e inibição do desenvolvimento da lesão aterosclerótica (44-45) sendo uma alternativa ou adjuvante para terapia medicamentosa. *E. faecium* CRL183 também preveniu o adenocarcinoma de mama (46), câncer de cólon quimicamente induzido (47) e ganho de peso corporal (48) em diferentes modelos murinos. É importante ressaltar que, em alguns desses estudos, o *E. faecium* CRL183 foi utilizado como cultura inicial de um produto à base de soja fermentado, combinado ou não com outras cepas probióticas, avaliando seus efeitos sistêmicos (43,45,47,48).

Objetivando ampliar a utilização da referida cepa probiótica, Witzler e colaboradores (2017) demonstraram que a cepa probiótica *E. faecium* CRL 183

liofilizada após microencapsulação pelo método de coacervação complexa, manteve-se viável à temperatura ambiente por um período de 280 dias e foi capaz de inibir o crescimento de *S. mutans*, constatado pela formação de um halo de inibição $1,7 \pm 0,3$ mm de diâmetro (43). Esse mesmo estudo evidenciou que *E. faecium* CRL183 foi resistente à saliva humana. Sendo capaz de se liberar da matriz alimentícia, sobreviver às enzimas salivares e se multiplicar (aumento de até $3,64 \log_{10}$ UFC/mL) na saliva após 24h, indicando uma possível capacidade de colonização da cavidade oral por esse probiótico (49). A cepa probiótica encapsulada e liofilizada foi posteriormente incorporada em uma pastilha alimentícia *diet* com potencial funcional. Entretanto, a viabilidade da cepa durante 28 dias de armazenamento à temperatura ambiente foi reduzida a valores considerados baixos para produtos probióticos ($1,86 \pm 0,07$ UFC/g) (49).

Outros estudos veicularam cepas probióticas como *L. reuteri* ou *L. brevis* em gomas de mascar e pastilhas de manitol obtendo efeitos benéficos como redução significativa de placa, população de *S. mutans* e de sangramentos gengivais (50, 51). Porém esses estudos não avaliaram aspectos tecnológicos da formulação como a sobrevivência do probiótico ao longo do tempo de armazenamento.

Tais resultados apontam para a necessidade do aprimoramento do processo de obtenção de formulações probióticas orais, que permitam a liberação controlada de doses conhecidas de organismos viáveis, resistam ao processo de fabricação, mantenham a estabilidade durante o armazenamento a longo prazo, de preferência sem necessidade de refrigeração, e cujos custos de produção sejam economicamente favoráveis (52).

Uma opção de veículo para microrganismos probióticos são os filmes orodispersíveis (ODF), que foram desenvolvidos na década de 1970, para populações com dificuldades de deglutição, ou disfagia, tornando-se uma alternativa a comprimidos, cápsulas e xaropes (53).

Porém, a primeira forma comercializada deste produto surgiu apenas em 2001, como refrescante bucal “Listerine” da Pfizer (53). Esta forma farmacêutica pode ser definida como uma fina película de fácil dissolução e elevada superfície de contato, que permite a liberação de todo componente ativo na cavidade oral. Dentre as vantagens atribuídas ao ODF pode-se citar: facilidade de manuseio e administração, não há necessidade de ingestão de água, evita o metabolismo de primeira

passagem e maior adesão do paciente ao tratamento (54).

Tanto a nomenclatura oficial, quanto a popular tem ampla variação. O FDA utiliza o termo “filmes solúveis”, enquanto que a agência europeia de medicamentos (EMA) adotou “filmes orodispersíveis”. Popularmente, esses filmes são conhecidos como “strip oral”, “filmes orais”, “tira oral”, “filme solúvel oral”, “dissofilme”, “filme solúvel bucal”, “filme mucoadesivo” e “filme transmucoso”, porém, apesar de serem usados de forma intercambiável, podem designar diferentes produtos (53).

A permanência do filme solúvel na cavidade oral, durante o tempo de desintegração, pode promover uma liberação mais eficiente de princípios ativos se comparado a outros produtos como géis orais que são facilmente retirados pelo fluxo salivar (55).

Os filmes orodispersíveis são compostos por macromoléculas, naturais ou sintéticas, formadoras de matriz polimérica, plastificantes - que aumentam as propriedades filmogênicas dos polímeros conferindo maior flexibilidade e menor fragilidade – e o ingrediente farmacêutico ativo (API) ou composto bioativo de interesse (53,54). A composição e proporção desses excipientes pode ser alterada de acordo com as características desejadas para o produto e a adição de edulcorantes, estimulante salivar, aromatizantes, flavorizantes, pigmentos, tensoativos e estabilizantes pode ser considerada (53).

De acordo com as características dos filmes, estes constituem veículos de substâncias bioativas ideais para pacientes com condições que favoreçam a disfagia como idosos, pacientes com debilidades motoras, imunocomprometidos, portadores de Alzheimer ou Parkinson. Coincidentemente, nesta população se observa alta prevalência de candidose (19, 25-27,53-55).

Considerando o exposto, o objetivo do presente estudo é avaliar se a cepa probiótica *E. faecium* CRL 183 é capaz de desestabilizar a formação e/ou maturação de biofilme de *C. albicans* ATCC 90028 *in vitro*. E se os filmes orodispersíveis seriam uma forma eficiente de veicular essa cepa na cavidade oral, promovendo a redução de risco de doenças orais ocasionadas por este fungo oportunista.

Objetivo Geral

Desenvolvimento de filmes orodispersíveis contendo *Enterococcus faecium* CRL 183, capaz de inibir a formação e/ou maturação de biofilme de *Candida albicans in vitro*.

Objetivos específicos

- Avaliar se a cepa probiótica *Enterococcus faecium* CRL 183 é capaz de se estabelecer e sobreviver em biofilmes polimicrobianos com *Candida albicans* ATCC 90028.

- Avaliar se essa cepa probiótica é capaz de desestabilizar a formação e/ou maturação de biofilmes de *Candida albicans in vitro*.

- Incorporar o microrganismo probiótico em filmes orodispersíveis e avaliar a viabilidade da cepa, bem como a estabilidade físico-química do produto durante o período de armazenamento.

- Avaliar se o filme orodispersível probiótico é capaz de desestabilizar a formação e/ou maturação de biofilmes de *Candida albicans in vitro*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O microrganismo probiótico *E. faecium* CRL 183 é capaz de se estabelecer em um biofilme polimicrobiano com *C. albicans* ATCC 90028, sem ter sua viabilidade celular comprometida. O probiótico foi capaz de inibir significativamente a formação e a maturação do biofilme fúngico *in vitro*, em todas as proporções de patógeno/probiótico testadas. A redução da carga de *C. albicans* foi superior às obtidas por abordagens semelhantes descritas na literatura utilizando outras cepas probióticas (99 a 99,9%, dependendo da condição experimental). Apesar da acidificação do meio, pela produção de ácido láctico, ser um dos mecanismos que explicam o antagonismo entre *E. faecium* e *C. albicans*, o pH do meio na presença de *E. faecium* CRL 183 manteve-se dentro da faixa de pH da saliva humana saudável.

A matriz polimérica composta por carboximetilcelulose, gelatina e fécula de batata produz um filme orodispersível de fácil obtenção e de baixo custo, capaz de envolver o microrganismo probiótico em sua estrutura sem lhe causar danos. Os filmes obtidos apresentaram boas propriedades mecânicas e de barreira, o que pode proteger o microrganismo probiótico das ações do ambiente explicando a alta viabilidade durante 90 dias de armazenamento à temperatura ambiente. A flexibilidade, alta capacidade de absorção de líquidos e o tempo de desintegração obtidos indicam que o ODF pode ser eficiente na liberação local de *E. faecium*, sendo mais resistente ao fluxo salivar do que enxaguantes ou géis orais, por exemplo. Por fim, filmes contendo *E. faecium* CRL 183 foram capazes de desestabilizar a formação (68 %) e a maturação (91%) de biofilmes de *C. albicans*, indicando que o consumo regular do ODF probiótico pode prevenir a colonização local por esse fungo. Entretanto, estudos mais aprofundados que comprovem os mecanismos pelos quais *E. faecium* CRL 183 antagoniza *C. albicans* ATCC 90028, bem como, a ação dos filmes probióticos em modelos de candidíase *in vivo* devem ser considerados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Probiotics in food Health and nutritional properties and guidelines for evaluation FAO FOOD AND NUTRITION PAPER. [citado 20 de julho de 2018]; Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-a0512e.pdf>
2. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 10 de agosto de 2014 [citado 20 de julho de 2018];11(8):506–14. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nrgastro.2014.66>
3. Coppola MM, Turnes CG. Probióticos e resposta imune. *Ciência Rural*. 2004;34(4):1297-303.
4. Matsubara VH, Bandara HM, Mayer MP, Samaranayake LP. Probiotics as Antifungals in Mucosal Candidiasis. *Clin Infect Dis*. 2016;62:1143–53.
5. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Resolução nº 241, de 26 de julho 2018. Requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos - Diário Oficial da União - Imprensa Nacional [Internet]. 2018 [citado 9 de agosto de 2018]. p. 97. Disponível em http://www.impresanacional.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/34379910/doi-2018-07-27-resolucao-da-diretoria-colegiada-rdc-n-241-de-26-de-julho-de-2018-34379900
6. Celiberto LS, Bedani R, Rossi EA, Cavallini DCU. Probiotics: The Scientific Evidence in the Context of Inflammatory Bowel Disease. *Crit Rev Food Sci Nutr* [Internet]. 21 de maio de 2015 [citado 21 de julho de 2018];00–00. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408398.2014.941457>
7. Pham LC, Van Spanning RJM, Röling WFM, Prosperi AC, Terefework Z, Ten Cate JM, et al. Effects of probiotic *Lactobacillus salivarius* W24 on the compositional stability of oral microbial communities. *Arch Oral Biol*. 2009;54(2):132–7.
8. Jiang Q, Stamatova I, Kainulainen V, Korpela R, Meurman JH. Interactions between *Lactobacillus rhamnosus* GG and oral micro-organisms in an in vitro biofilm model. *BMC Microbiol* [Internet]. 2016;16(1):1–11. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s12866-016-0759-7>
9. Pujia AM, Costacurta M, Fortunato L, Merra G, Cascapera S, Calvani M, et al. The probiotics in dentistry: a narrative review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2017;21(6):1405–12.
10. Jorge AOC. Microbiologia e Imunologia Oral. 1ed. Elsevier Editora LTDA; 2012
11. Finkel JS, Mitchell AP. Genetic Control of *Candida albicans* Biofilm Development. *Nat Rev Microbiol*. 2011;9(2):109–118.

12. Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME. *Staphylococcus aureus* biofilms Properties, regulation and roles in human disease. *Virulence*. 2011;2(5):445–59.
13. Beveridge TJ, Makin SA, Kadurugamuwa JL, Li Z. Interactions between biofilms and the environment. *FEMS Microbiol Rev* [Internet]. julho de 1997 [citado 23 de julho de 2018];20(3–4):291–303. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsre/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6976.1997.tb00315.x>
14. Boyd A, Chakrabarty AM. Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. julho de 1994 [citado 23 de julho de 2018];60(7):2355–9. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8074516>
15. Fanning S, Mitchell AP. Fungal Biofilms. *PLOS Pathog* [Internet]. 2012 [citado 23 de julho de 2018];8(4):e1002585. Disponível em: <http://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1002585>
16. Byun R, Nadkarni MA, Chhour K-L, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. Quantitative Analysis of Diverse *Lactobacillus* Species Present in Advanced Dental Caries. *J Clin Microbiol* [Internet]. 1 de julho de 2004 [citado 23 de julho de 2018];42(7):3128–36. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15243071>
17. Caufield PW, Schön CN, Saraithong P, Li Y, Argimón S. Oral Lactobacilli and Dental Caries: A Model for Niche Adaptation in Humans. *J Dent Res* [Internet]. setembro de 2015 [citado 23 de julho de 2018];94(9 Suppl):110S–8S. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25758458>
18. Lemos JA, Quivey RG, Koo H, Abranches J. *Streptococcus mutans*: a new Gram-positive paradigm? *Microbiology* [Internet]. 1 de março de 2013 [citado 23 de julho de 2018];159:436–45. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23393147>
19. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*. 2013;4(2):119–28.
20. Munson MA, Banerjee A, Watson TF, Wade WG. Molecular Analysis of the Microflora Associated with Dental Caries. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2004 [citado 23 de julho de 2018];42(7):3023–9. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC446285/pdf/1693-03.pdf>
21. Nase L, Hatakka K, Savilahti E, Saxelin M, Ponka A, Poussa T, et al. Effect of long-term consumption of a probiotic bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* GG, in milk on dental caries and caries risk in children. *Caries Res* 2001;35:412–20.
22. Samot J, Badet C. Clinical microbiology Antibacterial activity of probiotic candidates for oral health. *Anaerobe* [Internet]. 2013 [citado 23 de julho de 2018];19:34–8. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.11.007>

23. Ben Taheur F, Kouidhi B, Fdhila K, Elabed H, Ben Slama R, Mahdouani K, et al. Anti-bacterial and anti-biofilm activity of probiotic bacteria against oral pathogens. *Microb Pathog* [Internet]. 2016;97:213–20. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2016.06.018>
24. Andes D, Nett J, Oschel P, Albrecht R, Marchillo K, Pitula A. Development and Characterization of an In Vivo Central Venous Catheter *Candida albicans* Biofilm Model. *Infect Immun* [Internet]. 2004 [citado 18 de julho de 2018];72(10):6023–31. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC517581/pdf/0772-04.pdf>
25. Han KH, Park SJ, Choi SJ, Park JY, Lee KH. Immunological features of macrophages induced by various morphological structures of *Candida albicans*. *J Microbiol Biotechnol*. 2013;23(7):1031–40.
26. Mattei AS, Alves SH, Severo CB, Da Silva Guazzelli L, De Mattos Oliveira F, Severo LC. Determination of germ tube, phospholipase, and proteinase production by bloodstream isolates of *Candida albicans*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2013;46(3):340–2.
27. Matsubara VH, Wang Y, Bandara HMHN, Mayer MPA, Samaranayake LP. Probiotic lactobacilli inhibit early stages of *Candida albicans* biofilm development by reducing their growth, cell adhesion, and filamentation. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016;100(14):6415–26.
28. Niewerth M, Korting HC. Phospholipases of *Candida albicans*. *Mycoses*. 2001;44(9-10):361–7.
29. Zago CE, Silva S, Sanitá PV, Barbugli PA, Dias CMI, Lordello VB, et al. Dynamics of biofilm formation and the Interaction between *Candida albicans* and methicillin-susceptible (MSSA) and -resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *PLoS One*. 2015;10(4):1–15.
30. Shekh RM, Roy U. Biochemical characterization of an anti-Candida factor produced by *Enterococcus faecalis* [Internet]. 2012 [citado 7 de outubro de 2018]. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/12/132>
31. Ishikawa KH, Mayer MPA, Miyazima TY, Matsubara VH, Silva EG, Paula CR, et al. A Multispecies Probiotic Reduces Oral *Candida* Colonization in Denture Wearers. *J Prosthodont* [Internet]. abril de 2015;24(3):194–9. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/jopr.12198>
32. Mailänder-Sánchez D, Braunsdorf C, Grumaz C, Müller C, Lorenz S, Stevens P, et al. Antifungal defense of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG is mediated by blocking adhesion and nutrient depletion. Naglik JR, organizador. 12 de outubro de 2017 [citado 9 de agosto de 2018];12(10):e0184438. Disponível em: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0184438>
33. Vilela SFG, Barbosa JO, Rossoni RD, Santos JD, Prata MCA, Anbinder AL, et al. *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 inhibits biofilm formation by *C. albicans* and attenuates the experimental candidiasis in *Galleria mellonella*. *Virulence*. 2015;6(1):29–39.

34. Ribeiro FC, de Barros PP, Rossoni RD, Junqueira JC, Jorge AOC. *Lactobacillus rhamnosus* inhibits *Candida albicans* virulence factors in vitro and modulates immune system in *Galleria mellonella*. J Appl Microbiol [Internet]. janeiro de 2017 [citado 5 de novembro de 2018];122(1):201–11. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/jam.13324>
35. Nobile, C. J., & Johnson, A. D. (n.d.). *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. Annu Rev Microbiol. [Internet] 2015 [citado 02 de abril de 2019]; 69: 71–92. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104330>
36. Mason KL, Downward JRE, Falkowski NR, Young VB, Kao JY, Huffnagle GB. Interplay between the gastric bacterial microbiota and *Candida albicans* during postantibiotic recolonization and gastritis. Infect Immun [Internet]. 1 de janeiro de 2012 [citado 25 de setembro de 2018];80(1):150–8. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21986629>
37. Mason KL, Downward JRE, Mason KD, Falkowski NR, Eaton KA, Kao JY, et al. *Candida albicans* and Bacterial Microbiota Interactions in the Cecum during Recolonization following Broad-Spectrum Antibiotic Therapy. 2012; 80(10):3371-80.
38. Cruz MR, Graham CE, Gagliano BC, Lorenz MC, Garsin DA. *Enterococcus faecalis* inhibits hyphal morphogenesis and virulence of *Candida albicans*. Infect Immun [Internet]. janeiro de 2013 [citado 25 de setembro de 2018];81(1):189–200. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23115035>
39. Graham CE, Cruz MR, Garsin DA, Lorenz MC. *Enterococcus faecalis* bacteriocin EntV inhibits hyphal morphogenesis, biofilm formation, and virulence of *Candida albicans*. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 25 de abril de 2017 [citado 25 de setembro de 2018];114(17):4507–12. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28396417>
40. Bachtiar EW, Dewiyani S, Surono Akbar SM, Bachtiar BM. Inhibition of *Candida albicans* biofilm development by unencapsulated *Enterococcus faecalis* cps2. J Dent Sci [Internet]. 2016;11(3):323–30. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jds.2016.03.012>
41. Hanchi, H., Mottawea, W., Sebei, K., & Hammami, R. The Genus *Enterococcus*: Between Probiotic Potential and Safety Concerns-An Update. *Frontiers in Microbiology*. 2018; 9, 1791.
42. Saavedra L, Taranto MP, Sesma F, De Valdez GF. Homemade traditional cheeses for the isolation of probiotic *Enterococcus faecium* strains. Int J Food Microbiol. 2003;88(2–3):241–5.

43. Celiberto LS, Bedani R, Dejana NN, Ivo de Medeiros A, Sampaio Zuanon JA, Spolidorio LC, et al. (2017) Effect of a probiotic beverage consumption (*Enterococcus faecium* CRL 183 and *Bifidobacterium longum* ATCC 15707) in rats with chemically induced colitis. PLoS ONE. [Internet].2017 [citado 21 de julho de 2018]; 12(4): e0175935. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175935>
44. Cavallini DCU, Bedani R, Bomdespacho LQ, Vendramini RC, Rossi EA. Effects of probiotic bacteria, isoflavones and simvastatin on lipid profile and atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits: a randomized double-blind study. Lipids Health Dis [Internet]. 2009 [citado 25 de setembro de 2018];8(1):1. Disponível em: <http://lipidworld.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-511X-8-1>
45. Cavallini DCU, Suzuki JY, Abdalla DSP, Vendramini RC, Pauly-Silveira ND, Roselino MN, et al. Influence of a probiotic soy product on fecal microbiota and its association with cardiovascular risk factors in an animal model. Lipids Health Dis [Internet]. 2011 [citado 25 de setembro de 2018];10(1):126. Disponível em: <http://lipidworld.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-511X-10-126>
46. Kinouchi F, Maia D, de Abreu Ribeiro L, Placeres M, De Valdez G, Colombo L, et al. A soy-based product fermented by *Enterococcus faecium* and *Lactobacillus helveticus* inhibits the development of murine breast adenocarcinoma. Food Chem. Toxicol.2012; 50, 4144–4148
47. Sivieri K, Spinardi-Barbisan ALT, Barbisan LF, Bedani R, Pauly ND, Carlos IZ, et al. Probiotic *Enterococcus faecium* CRL 183 inhibit chemically induced colon cancer in male Wistar rats. Eur Food Res Technol.2008;228(2):231–7.
48. Marchesin JC, Celiberto LS, Orlando AB, De Medeiros AI, Pinto RA, Zuanon JAS, et al. A soy-based probiotic drink modulates the microbiota and reduces body weight gain in diet-induced obese mice. J Funct Foods [Internet]. 2018;48(June):302–13. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.07.010>
49. Witzler JJP, Pinto RA, Font de Valdez G, de Castro AD, Cavallini DCU. Development of a potential probiotic lozenge containing *Enterococcus faecium* CRL 183. LWT - Food Sci Technol. 2017;77:193–9.
50. Çaglar E, kavaloglu SC, kuscü OO, Sandalli N, Holgersson PL, Twetman S. Effect of chewing gums containing xylitol or probiotic bacteria on salivary mutans streptococci and lactobacilli. Clinical Oral Investigation.2007; 11:425-429.
51. Campus G, Cocco F, Carta G, Simark-Mattson C, Strohmenger L, Lingström P. Effect of a daily dose of *Lactobacillus brevis* CD2 lozenges in high caries risk schoolchildren. Clinical Oral Investigation. 2014;18:555-556.
52. De Barros JMS, Scherer T, Charalampopoulos D, Khutoryanskiy V V., Edwards AD. A Laminated Polymer Film Formulation for Enteric Delivery of Live Vaccine and Probiotic Bacteria. J Pharm Sci. Julho de 2014;103(7):2022–32.

53. Lee Y, Kim K, Kim M, Choi DH, Jeong SH. Orally disintegrating films focusing on formulation, manufacturing process, and characterization. *J Pharm Investig*. 2017;47(3):183–201.
54. Dixit RP, Puthli SP. Oral strip technology: Overview and future potential. *J Control Release* [Internet]. outubro de 2009 [citado 6 de outubro de 2018];139(2):94–107. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016836590900426X>
55. Borges JG, Silva AG, Cervi-Bitencourt CM, Vanin FM, Carvalho RA. Lecithin, gelatin and hydrolyzed collagen orally disintegrating films: functional properties. *Int J Biol Macromol* [Internet]. maio de 2016 [citado 6 de outubro de 2018];86:907–16. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813016300915>