



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Gabriel Sanabria da Silva

Investigação de atividade antimicrobiana de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* provenientes de cama de aviário contra espécies de *Candida*

Florianópolis
2024

Gabriel Sanabria da Silva

Investigação de atividade antimicrobiana de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* provenientes de cama de aviário contra espécies de *Candida*

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de Graduação em Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Thaís Cristine Marques Sincero

Coorientador(a): Prof^a. Dr^a Jussara Kasuko Palmeiro

Florianópolis

2024

Silva, Gabriel Sanabria da

Investigação de atividade antimicrobiana de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* provenientes de cama de aviário contra espécies de *Candida* / Gabriel Sanabria da Silva ; orientadora, Thaís Cristine Marques Sincero, coorientador, Jussara Kasuko Palmeiro, 2024.

53 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Microbiologia. 3. Atividade antimicrobiana. 4. Resistência antimicrobiana. I. Sincero, Thaís Cristine Marques. II. Palmeiro, Jussara Kasuko. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Farmácia. IV. Título.

Gabriel Sanabria da Silva

Investigação de atividade antimicrobiana de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* provenientes de cama de aviário contra espécies de *Candida*

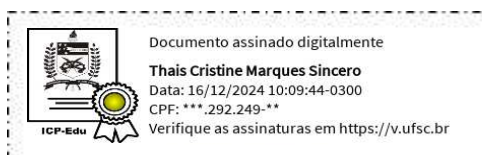
Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Farmacêutico e aprovado em sua forma final pelo Curso de Graduação em Farmácia

Florianópolis, 05 de dezembro de 2024.

Insira neste espaço
a assinatura

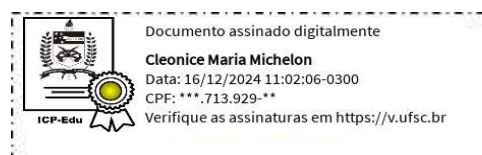
Coordenação do Curso

Banca examinadora



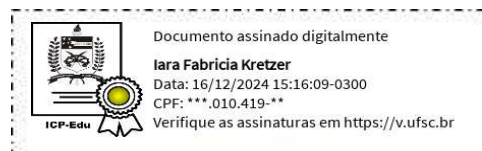
Prof^a. Dr^a. Thaís Cristine Marques Sincero

Orientadora



Prof^a. Dr^a. Cleonice Maria Michelin

Universidade Federal de Santa Catarina



Prof^a. Dr^a. Iara Fabricia Kretzer

Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 2024.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus amados pais, Sérgio e Rosana, pelo amor incondicional, dedicação e apoio inestimável, além de sempre acreditarem em mim e me incentivarem a ser alguém melhor em todos os aspectos da minha vida.

Agradeço às minhas amigas de graduação Amanda, Emily, Julia, Isadora e Adrieli, por tornarem essa longa jornada mais leve e cheia de momentos especiais. Vocês foram minha rede de apoio nos momentos mais difíceis dessa missão.

Agradeço às minhas queridas professoras Thaís e Jussara pela paciência, por despertarem minha paixão pela Microbiologia, por serem uma inspiração constante e me orientarem com tanta dedicação.

Agradeço à minha banca examinadora, Cleonice e Lara, professoras que admiro profundamente, pela disponibilidade em participar da avaliação do meu trabalho desde a concepção, no projeto, até sua conclusão. Em especial, meu agradecimento à professora Lara por fornecer os isolados de *Candida* que tornaram este trabalho possível.

Agradeço à Sara, profissional do setor de Micologia do HU, pelos ensinamentos e discussões enriquecedoras que tivemos a respeito deste tema.

Aos meus queridos amigos do MiMA, agradeço pela formação científica, o conhecimento compartilhado e pelos momentos de descontração que vivemos juntos. Cada cafezinho, almoço no RU, risada, karaokês e conversas fizeram esta etapa ser maravilhosa e inesquecível. Sou grato pela sorte que tive em conhecê-los e ter sido acolhido por todos vocês. Para Isadora, Juliana, Júlia, Maduda, Sabrina, Kharol, Luana, Mateus, Victor e Gustavo: meu muito obrigado!

Agradeço a empresa Biotecnal pela parceria, por fomentar a pesquisa no ambiente acadêmico e disponibilizar as amostras que tornaram este trabalho possível.

Por fim, agradeço à Universidade Federal de Santa Catarina e a todos os professores do curso de Farmácia pela excelente formação acadêmica que recebi.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da iturina, surfactina e fengicina, respectivamente	31
Figura 2 - Inibição de espécies de <i>Candida</i> na triagem primária pelo método de cross-streak	39
Figura 3 - Inibição contra <i>Candida glabrata</i> (esquerda), <i>Candida parapsilosis</i> (centro) e <i>Candida albicans</i> (direita) por três isolados de <i>Bacillus subtilis</i> pelo método de poços em placa.	39
Figura 4 - Heatmap dos valores, em milímetros, de inibição da triagem primária pelo método de cross-streak	42
Figura 5 - Heatmap dos valores, em milímetros, de inibição da triagem secundária pelo método de difusão de poços em placa	43

RESUMO

A resistência aos antimicrobianos é uma ameaça crescente à saúde pública, associada a milhões de mortes anuais e a elevados impactos econômicos, como o aumento dos custos hospitalares e a redução do Produto Interno Bruto (PIB) global devido à queda na produtividade. Intensificada pelo uso indiscriminado de antimicrobianos, essa crise compromete tratamentos médicos essenciais, levando a um cenário de urgência para o desenvolvimento de novos fármacos. Nesse contexto, a Organização Mundial da Saúde (OMS) prioriza o enfrentamento de patógenos críticos, como *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenêmicos e *Candida albicans*. Neste cenário, o gênero *Candida*, normalmente membro da microbiota comensal, pode se tornar patogênico em condições de imunossupressão e uso indiscriminado de antimicrobianos, causando infecções invasivas desafiadoras. O gênero *Bacillus* é uma fonte promissora de metabólitos antimicrobianos devido à sua ampla distribuição e capacidade de produzir compostos bioativos com propriedades antifúngicas. Espécies como *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* se destacam por sua relevância comercial, ausência de patogenicidade e capacidade de secretar metabólitos com atividade antimicrobiana. Neste estudo, a cama de aviário foi explorada como fonte para o isolamento de *Bacillus*, devido à sua composição rica em matéria orgânica e comunidade microbiana pouco conhecida. Assim, este trabalho investigou a atividade antifúngica de metabólitos produzidos por *Bacillus*, buscando alternativas eficazes para enfrentar a resistência antimicrobiana e contribuir para a saúde pública. A atividade antimicrobiana de 35 isolados de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* contra *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* foi avaliada em duas etapas: uma triagem primária, utilizando o método de *cross-streak*, e uma triagem secundária, por meio do método de difusão em poços em placa. Durante a triagem primária, 23 isolados de *Bacillus subtilis* e um de *Bacillus licheniformis* demonstraram atividade antimicrobiana contra *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida parapsilosis*. Na triagem secundária, os 24 isolados confirmaram a atividade antimicrobiana contra essas três espécies de *Candida*. Esses resultados reforçam o potencial do gênero *Bacillus* como uma fonte promissora de novas moléculas para o combate a patógenos fúngicos de prioridade crítica para a saúde humana.

Palavras-chave: atividade antifúngica; *Bacillus*; *Candida*.

ABSTRACT

Investigation of antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* from poultry litter against *Candida* species

Antimicrobial resistance is a growing public health threat, associated with millions of deaths annually and significant economic impacts, such as increased hospital costs and reduced global Gross Domestic Product (GDP) due to decreased productivity. Intensified by the indiscriminate use of antimicrobials, this crisis compromises essential medical treatments, leading to an urgent need for the development of new drugs. In this context, the World Health Organization (WHO) prioritizes tackling critical pathogens, such as carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Candida albicans*. In this scenario, the *Candida* genus, normally a member of the commensal microbiota, can become pathogenic under conditions of immunosuppression and indiscriminate use of antimicrobials, causing challenging invasive infections. The *Bacillus* genus is a promising source of antimicrobial metabolites due to its wide distribution and ability to produce bioactive compounds with antifungal properties. Species such as *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* stand out for their commercial relevance, lack of pathogenicity and ability to secrete metabolites with antimicrobial activity. In this study, poultry litter was explored as a source for the isolation of *Bacillus*, due to its composition rich in organic matter and little-known microbial community. Thus, this work investigated the antifungal activity of metabolites produced by *Bacillus*, seeking effective alternatives to face antimicrobial resistance and contribute to public health. The antimicrobial activity of 35 isolates of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* was evaluated in two stages: a primary screening, using the cross-streak method, and a secondary screening, using the well-plate diffusion method. During the primary screening, 23 isolates of *Bacillus subtilis* and 1 of *Bacillus licheniformis* demonstrated antimicrobial activity against *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Candida parapsilosis*. In the secondary screening, the 24 isolates confirmed antimicrobial activity against these three *Candida* species. These results reinforce the potential of the *Bacillus* genus as a promising source of new molecules to combat fungal pathogens of critical priority for human health.

Keywords: antifungal activity; *Bacillus*; *Candida*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 TIPOS DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA	19
2.1.1 Resistência fúngica	19
2.2 FATORES QUE ACELERAM O DESENVOLVIMENTO DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA	20
2.3 A IMPORTÂNCIA DE ESPÉCIES DE <i>CANDIDA</i>	22
2.3.1 <i>Candida albicans</i>	23
2.3.2 <i>Candida glabrata</i>	24
2.3.3 <i>Candida krusei</i>	24
2.3.4 <i>Candida parapsilosis</i>	25
2.3.5 <i>Candida tropicalis</i>	26
2.4 O GÊNERO <i>BACILLUS</i>	26
2.4.1 Grupo <i>Bacillus subtilis</i>	27
2.4.2 Potencial antimicrobiano do gênero <i>Bacillus</i>	29
3 JUSTIFICATIVA	31
4 OBJETIVOS	33
4.1 OBJETIVO GERAL	33
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
5 METODOLOGIA	34
5.1 PROSPECÇÃO DAS AMOSTRAS E OBTENÇÃO DOS ISOLADOS	35
5.2 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS	36
5.3 TRIAGEM PRIMÁRIA: <i>CROSS-STREAK</i>	37
5.4 TRIAGEM SECUNDÁRIA: POÇOS EM PLACA (<i>Well-diffusion</i>)	37
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
REFERÊNCIAS	48
APÊNDICE A - RESULTADOS DE INIBIÇÃO EM DUPLICATA DA TRIAGEM PRIMÁRIA, EM MILÍMETROS	54
APÊNDICE B – RESULTADOS DE INIBIÇÃO EM DUPLICATA DA TRIAGEM SECUNDÁRIA, EM MILÍMETROS	56

1 INTRODUÇÃO

A resistência aos antimicrobianos é uma crescente ameaça à saúde pública, que está atrelada a gigantescos impactos sociais e econômicos. A Organização Mundial da Saúde (OMS) afirma que este fenômeno é responsável por 4,95 milhões de mortes por ano em todo o mundo (OMS, 2023). Além dos óbitos, outros procedimentos bem sucedidos da medicina tornam-se extremamente perigosos, pois o manejo de infecções em locais cirúrgicos, transplante de órgãos, quimioterapia e cirurgias, como as cesarianas, são dependentes de antimicrobianos eficazes para terem sucesso (Nwobodo *et al.*, 2022). Somado a estes fatores, tem-se a perspectiva econômica, que é influenciada, não apenas por gastos aumentados com hospitalizações e medicamentos, mas também por consequências indiretas relacionadas ao comércio e ao PIB (Produto Interno Bruto). O aumento da resistência pode levar a uma redução de 2% a 3,8% do PIB mundial, correspondente a uma perda de até 100 trilhões de dólares, pois a mortalidade e morbidade de infecções causadas por patógenos resistentes afetaria diretamente a força de trabalho, ocasionando queda de produtividade (Jim O'Neill, 2014). Simulações feitas pensando em dois possíveis cenários impactados por resistência antimicrobiana alegam que em uma perspectiva mais otimista, o PIB global anual cairia em torno de 1,1% até 2050, com déficit anual superior a 1 bilhão de dólares até 2030, enquanto em uma perspectiva pessimista, o mundo perderá 3,8% do seu PIB anual até 2050, com déficit anual de 3,4 bilhões de dólares até 2030 (Jones *et al.*, 2017). A troca de antimicrobianos de primeira linha durante um tratamento devido à aquisição de resistência também agrega valores ao custo final, pois os antimicrobianos de segunda ou terceira linha são mais caros e eventualmente mais perigosos (Nwobodo *et al.*, 2022).

Os microrganismos tornam-se resistentes quando deixam de responder aos medicamentos antimicrobianos (OMS, 2023). Este processo é natural e ocorre ao longo do tempo em decorrência de alterações genéticas em patógenos, contudo, devido à atividade humana, representada pelo uso indevido e excessivo de antimicrobianos para tratar, prevenir ou controlar infecções em humanos, animais e plantas, o surgimento e propagação da resistência são acelerados (OMS, 2023). O uso de antimicrobianos exerce uma pressão seletiva sobre a população de microrganismos acometidos, em uma relação diretamente proporcional; logo, quanto mais antimicrobianos forem usados, maior será a pressão existente (Nwobodo *et al.*, 2022).

Em resposta a esta problemática, a OMS publicou listas de bactérias e fungos considerados “patógenos prioritários”, divididos em três categorias de prioridade (crítica, alta e média), de acordo com a urgência de necessidade de novos antimicrobianos, em uma tentativa de orientar e promover o desenvolvimento de novos medicamentos para enfrentar a crescente resistência global aos fármacos antimicrobianos (OMS, 2017; OMS, 2022). A partir de 2024, com uma atualização da lista, a maior prioridade bacteriana passou a ser *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenêmicos, enquanto, a maiores prioridades fúngicas, desde 2022, incluem *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans* (OMS, 2022; OMS, 2024).

As leveduras do gênero *Candida* são membros comuns da microbiota comensal do trato gastrointestinal, genitourinário, cavidades orais e superfícies cutâneas e mucosas em humanos, sendo tipicamente inofensivas devido ao controle exercido pela microbiota coexistente, pelas barreiras epiteliais intactas e pelas defesas do sistema imunológico inato (Jamiu; Albertyn; Sebolai; Pohl, 2020). No entanto, em situações de desequilíbrio ou imunossupressão, podem tornar-se patogênicas e causar infecções invasivas.

A candidíase invasiva é uma infecção grave que pode comprometer diversas partes do corpo, como coração, cérebro, olhos, ossos e sangue, abrangendo tanto a candidemia, caracterizada pela presença de *Candida* na corrente sanguínea, quanto a candidíase de tecido profundo, que envolve infecções em órgãos internos resultantes de disseminação hematogênica ou introdução direta do patógeno em locais estéreis (Jamiu; Albertyn; Sebolai; Pohl, 2020). Essas manifestações representam um desafio clínico significativo, especialmente em pacientes imunocomprometidos.

Embora atualmente exista uma corrida incessante em busca de novos antimicrobianos, curiosamente o mais famoso representante desta classe de medicamentos, a penicilina, foi descoberto por um feliz acaso. Em 1928, Alexander Fleming observou que o crescimento de um fungo contaminante, posteriormente identificado como pertencente ao gênero *Penicillium*, foi capaz de inibir o crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus* na placa de petri (Tortora, 2017, p. 549).

Neste contexto, bactérias do gênero *Bacillus* são excelentes pontos de partida para a busca de novas moléculas com atividade antimicrobiana, pois são difundidas pelo solo e são capazes de produzir muitos compostos antibacterianos e antifúngicos, com intuito de desenvolver um mecanismo de defesa contra outros microrganismos existentes no ecossistema, de modo a aumentar suas chances de adaptação em

ambientes hostis (Pino-Hurtado *et al.*, 2023). Além disso, em resposta ao contato frequente e direto com o ambiente, espécies de *Bacillus* também estão presentes no trato gastrointestinal e fezes de diferentes animais aquáticos e terrestres, incluindo galinhas (Mingmongkolchai; Panbangred, 2018).

A cama de aviário corresponde a cama após ser utilizada pelas aves e é composta, principalmente, de excrementos desses animais, material da cama (arroz, palha, casca de amendoim, serragem, aparas de madeira), penas, insetos, ração derramada ou qualquer outro material deixado no chão dos aviários, acompanhada de uma comunidade microbiana total pouco conhecida (Crippen *et al.*, 2021).

Bacillus subtilis e *Bacillus licheniformis* destacam-se como duas das bactérias mais relevantes do ponto de vista comercial, pois são amplamente empregadas na produção de metabólitos como vitaminas, aminoácidos, antimicrobianos e enzimas industriais, cuja exploração tem sido impulsionada pela ausência de patogenicidade dessas espécies e pela notável capacidade de secretar proteases e outras enzimas em meio de cultura (Harwood *et al.*, 2018).

Portanto, através das problemáticas apresentadas em torno da resistência antimicrobiana e tendo em vista a redução de fármacos eficientes contra os atuais microrganismos resistentes e a preocupação de um retorno à era “pré-antibiótica”, este trabalho tem a proposta de investigar substâncias antimicrobianas produzidas por *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* capazes de combater fungos patogênicos de interesse para a saúde pública.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 TIPOS DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

Em resposta ao uso de antimicrobianos, a plasticidade genética das bactérias possibilita a aquisição de mecanismos de resistência, através de mutações adaptativas e ganho de porções de DNA por meio de transferência horizontal de genes de resistência (Helmy *et al.*, 2023). Os fungos, quando expostos a agentes antifúngicos ou a seus análogos estruturais, também são capazes de adquirir resistência (Ben-Ami; Kontoyiannis, 2021). Todavia, a resistência pode ser uma manifestação natural de bactérias que apresentam certas propriedades herdadas, como a presença de lipopolissacarídeo, que atua como uma barreira inata contra a entrada de antimicrobianos (Helmy *et al.*, 2023), ou de fungos inerentemente não sensíveis a certos tipos de antifúngicos, independente de exposição prévia ao respectivo fármaco (Ben-Ami; Kontoyiannis, 2021). Clinicamente, a resistência é entendida como uma alta probabilidade de falha terapêutica, mesmo quando há aumento de exposição a um determinado agente antimicrobiano (EUCAST, 2019).

2.1.1 Resistência fúngica

Os fungos, em exposição concomitante aos antimicrobianos junto às bactérias, também são microrganismos aptos a desenvolver mecanismos de resistência para sobreviver às principais classes de antifúngicos disponíveis atualmente. Os principais mecanismos de resistência aos antifúngicos incluem: a interação entre fármaco e alvo alterada devido a modificações na sequência de aminoácidos da proteína-alvo e concentração citoplasmática do fármaco reduzida em virtude de modificações na parede celular que diminuem a absorção do fármaco ou da expressão de bombas de efluxo (Czajka *et al.*, 2023).

Os compostos azólicos são antifúngicos inibidores da enzima 14 α -desmetilase, responsável pela conversão do lanosterol em ergosterol, o principal esterol presente na membrana celular fúngica, portanto, com a depleção de ergosterol, tem-se uma inibição da replicação (Rang *et al.*, 2016). Mutações pontuais em ERG11, gene responsável por codificar a enzima-alvo, levam a uma diminuição de afinidade que resulta em resistência aos azólicos, pois as substituições de aminoácidos provenientes da mutação causam

alterações estruturais no sítio ativo da 14 α -desmetilase (Perlin; Rautemaa-Richardson; Alastruey-Izquierdo, 2017). Outros mecanismos de resistência que afetam os azólicos incluem a indução de bombas de efluxo e a regulação positiva da expressão 14 α -desmetilase, devido a mutações em fatores de transcrição do gene ERG11 (Ben-Ami; Kontoyiannis, 2021).

As equinocandinas são peptídeos cíclicos fungicidas que comprometem a síntese da parede celular fúngica através de uma ligação não competitiva a subunidade Fks da enzima glucano sintase (Czajka *et al.*, 2023). O mecanismo de resistência às equinocandinas está associado a mutações adquiridas nos genes FKS, que codificam as subunidades catalíticas da enzima alvo do fármaco (Perlin; Rautemaa-Richardson; Alastruey-Izquierdo, 2017). Entretanto, diferente dos antifúngicos azólicos, as equinocandinas não são consideradas bons substratos para a maioria das bombas de efluxo (Ben-Ami; Kontoyiannis, 2021).

Os polienos, como anfotericina B e nistatina, são fármacos que atuam na membrana plasmática do fungo, ligando-se a moléculas de ergosterol, para formar poros que resultam em extravasamento de conteúdo celular (Czajka *et al.*, 2023).

A resistência aos polienos envolve, basicamente, a diminuição de ergosterol da membrana celular, portanto, tratamento com azóis pode conferir resistência a polienos devido a concentração reduzida do esteroide celular fúngico (Perlin; Rautemaa-Richardson; Alastruey-Izquierdo, 2017). Embora seja possível, os relatos de cepas resistentes aos polienos são raros, apesar de décadas de uso destes fármacos em ambiente clínico, pois acredita-se que a eficácia da atividade fungicida na eliminação de infecções previne a evolução de cepas mutantes resistentes (Czajka *et al.*, 2023).

2.2 FATORES QUE ACELERAM O DESENVOLVIMENTO DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

O desenvolvimento de resistência é um processo multifatorial, acelerado drasticamente por meio de condutas inadequadas exercidas por diversos agentes envolvidos no uso de antimicrobianos, tais como prescritores, pacientes, a indústria pecuária e agrícola.

A incerteza diagnóstica é um desafio recorrente para os prescritores de antimicrobianos. Quadros clínicos de etiologia viral ou bacteriana podem ter aspectos semelhantes, o que pode promover a prescrição excessiva de antibacterianos, mesmo

quando não há indicações adequadas (Prestinaci; Pezzotti; Pantosti, 2015). Aliado a este problema, tem-se a falta de suporte para o diagnóstico adequado, que muitas vezes não é acessível para os médicos. Diagnósticos inadequados, lentos ou imprecisos incentivam a utilização de terapias empíricas para cobrir a possibilidade de uma infecção possivelmente responsável pela doença de um paciente, mesmo quando não é o caso (OMS, 2001). A falta de conhecimento também enquadra-se como um dos principais fatores responsáveis pelo uso inadequado de antimicrobianos pelo mundo, afinal, mesmo em países desenvolvidos, os currículos de graduação de medicina são limitados em relação à farmacologia, mecanismo de ação, espectro de atividade e questões relacionadas à resistência aos agentes antimicrobianos (OMS, 2001).

Os pacientes, junto aos prescritores, desempenham um papel fundamental na aceleração e disseminação de resistência antimicrobiana, principalmente no que tange à má adesão e automedicação. O ato de automedicar-se com antimicrobianos frequentemente é feito em doses desnecessárias e inadequadas, resultando em um ambiente ideal para os microrganismos adaptarem-se ao invés de serem eliminados (Prestinaci; Pezzotti; Pantosti, 2015). A automedicação ocorre, pois muitos pacientes possuem uma percepção equivocada de que a maioria dos episódios suspeitos de infecção exige uma terapia antimicrobiana, e essa expectativa incide nos profissionais de saúde, que tem suas práticas de prescrição influenciadas pelas demandas e expectativas dos pacientes (OMS, 2001). Por outro lado, a má adesão, na maioria dos casos, é resultado de uma falha de compreensão do paciente e comunicação com o prescritor (OMS, 2001). Pacientes incapazes de completar a terapia apresentam maiores chances de recidiva, desenvolvimento de resistência e necessidade de novo tratamento, especialmente para aqueles que necessitam de um tratamento prolongado (OMS, 2001).

A criação de animais e cultivo de vegetais para consumo humano também destacam-se como setores seriamente afetados, pois fomentaram um problema que inevitavelmente voltou-se contra suas próprias produções. Com o aumento da circulação de patógenos resistentes, os tratamentos aplicados nos rebanhos da pecuária tornam-se menos eficazes e tem-se como resultado a queda da produtividade e aumento do preço das principais proteínas animais: carnes, ovos e leite (Dadgostar, 2019). Esta falha terapêutica ocorre pois o uso de antimicrobianos na pecuária não é racional, e extrapola a aplicação apenas em animais doentes. Os antimicrobianos são adicionados em grandes quantidades à alimentação e à água de animais saudáveis, de forma profilática, em níveis subterapêuticos, com o objetivo de prevenir doenças (Dadgostar, 2019).

Portanto, acredita-se que a criação de animais destinados ao consumo, com o uso indiscriminado de antibióticos em escala industrial, seja um dos principais responsáveis pelo surgimento e disseminação de bactérias portadoras de resistência a antimicrobianos (Vidovic; Vidovic, 2020). O uso destes medicamentos no processo de criação de animais representa um risco à saúde humana, pois contribui para o desenvolvimento de microrganismos resistentes a antimicrobianos e torna viável a transmissão de patógenos resistentes por meio de: contato direto e próximo entre humanos e animais produtores de alimentos, ingestão de alimentos e água contaminados, importação de produtos provenientes da pecuária, esterco de animais e águas residuais ou esgoto (Helmy *et al.*, 2023). Portanto, o elo entre infecções por patógenos alimentares e a pecuária e agricultura é inegável. Os alimentos de origem animal, especialmente crus ou mal cozidos (carnes, ovos, leite e peixes) são associadas ao risco maior de infecção alimentar pois os animais são reservatórios de importantes bactérias patogênicas. A produção agrícola de frutos e hortaliças também é exposta a riscos relacionados ao uso de água de irrigação e estercos inseguros, má higiene dos trabalhadores, controle inadequado de pragas e limpeza inadequada de equipamentos e utensílios de higienização ou colheita (Antunes; Novais; Peixe, 2020).

Junto às bactérias, os fungos demandam o uso de antimicrobianos em produções agropecuárias. A utilização de agentes fungicidas tornou-se essencial para a preservação e segurança da produção agrícola, pois as perdas de colheitas causadas por fungos patogênicos são devastadoras (Woods; Mcalister; Geddes-Mcalister, 2023). Contudo, a pressão seletiva causada pelo uso clínico e agrícola de agentes antifúngicos reflete diretamente na evolução da resistência em fungos patogênicos (Ben-Ami; Kontoyiannis, 2021). Desta forma, a baixa adesão às terapias prescritas, o uso profilático e a exposição a longo prazo na clínica junto com o uso de fungicidas agrícolas atua de forma sinérgica para o surgimento da resistência antifúngica e reservatórios ambientais de organismos resistentes (Perlin; Rautemaa-Richardson; Alastruey-Izquierdo, 2017).

2.3 A IMPORTÂNCIA DE ESPÉCIES DE *CANDIDA*

Atualmente, patógenos fúngicos configuram uma ameaça importante à saúde pública, pois estão se tornando cada vez mais comuns e resistentes aos tratamentos disponíveis (OMS, 2022). O uso generalizado e indevido das opções limitadas disponíveis culminou em maior resistência de patógenos fúngicos aos agentes

antifúngicos disponíveis (Jamiu; Albertyn; Sebolai; Pohl, 2020). Diversas espécies de *Candida* são seres comensais que residem de maneira inofensiva nas mucosas (oral, vaginal, gastrointestinal) de hospedeiros saudáveis, contudo, em indivíduos suscetíveis, esses microrganismos possuem um caráter oportunista, e podem causar infecções invasivas (Pappas *et al.*, 2018; Czajka *et al.*, 2023).

A candidíase invasiva é uma infecção com potencial de afetar qualquer órgão, normalmente através de uma infecção prévia na corrente sanguínea (Pappas *et al.*, 2018), com uma taxa de mortalidade estimada que pode chegar a 45% (Pristov; Ghannoum, 2019). Neste contexto, diversos fatores contribuem para o aumento e a ocorrência desta condição clínica. Os possíveis fatores de risco envolvidos incluem condições intrínsecas, como colonização por espécies de *Candida*, diabetes mellitus, perfuração gastrointestinal, idade avançada, pancreatite, sepse e gravidade da doença, bem como fatores iatrogênicos, como diálise, uso de antimicrobianos de amplo espectro, cateter venoso central, corticosteroides, imunossupressores, cirurgias de grande porte, dispositivos de assistência ventricular, internações prolongadas, ventilação mecânica, nutrição parenteral total e, nos pacientes imunocomprometidos, a presença de doença do enxerto contra o hospedeiro, mucosite, neutropenia profunda e histórico de transplante de órgãos ou de células-tronco (Pappas *et al.*, 2018).

Além de fatores relacionados à saúde do hospedeiro, a patogênese da candidíase está associada a fatores de virulência expressos pela levedura, que incluem: a formação de tubo germinativo, aderências, troca fenotípica, formação de biofilmes e produção de enzimas hidrolíticas (Pristov; Ghannoum, 2019).

Diferentes espécies de *Candida* podem atuar como patógenos em humanos, porém, a maioria das infecções invasivas são causadas por cinco espécies principais: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e *Candida krusei* (Pappas *et al.*, 2018).

2.3.1 *Candida albicans*

Candida albicans é a espécie mais importante do gênero, pois ainda é o principal agente etiológico de candidíase, todavia, nos últimos anos, houve um aumento significativo de casos de candidíase atribuídos a espécies de *Candida* não *albicans* (Jamiu; Albertyn; Sebolai; Pohl, 2020; Kountchou *et al.*, 2023).

A resistência às principais classes de antifúngicos é uma realidade estabelecida para *Candida albicans* e também para as espécies não *albicans* mais relevantes no ambiente clínico. Os mecanismos que desencadeiam a resistência antifúngica são muito semelhantes entre as espécies de *Candida*, embora, algumas espécies tenham suas próprias particularidades.

Candida albicans apresenta resistência aos azóis através de mecanismos envolvendo mutações no gene ERG11, responsável por codificar a enzima-alvo do fármaco, mutações de ganho de função levam a uma regulação positiva constitutiva do gene Erg11 ou mutações em fatores de transcrição que desencadeiam uma expressão aumentada de bombas de efluxo multidrogas CDR1 e CDR2 (Ben-Ami; Kontoyiannis, 2021). Em equinocandinas, a resistência ocorre devido a mutações no gene FKS1, já identificadas em *Candida albicans* (Czajka *et al.*, 2023). A co-resistência aos azóis e anfotericina B também pode ser observada em cepas de *Candida albicans* que apresentam mutações na via de biossíntese do ergosterol, que levam a substituição do ergosterol por outros intermediários de esterol (Ben-Ami; Kontoyiannis, 2021).

2.3.2 *Candida glabrata*

Candida glabrata é a segunda causa mais comum de candidíase invasiva globalmente (Czajka *et al.*, 2023) e configura-se como a espécie mais frequentemente associada a resistência em ambiente hospitalar (Pristov; Ghannoum, 2019). As infecções causadas por *Candida glabrata* possuem maior incidência em adultos, especialmente acima dos 60 anos e receptores de transplante de órgãos sólidos (Pappas *et al.*, 2018; Jamiu; Albertyn; Sebolai; Pohl, 2020).

A resistência aos azóis em *Candida glabrata* é principalmente atribuída à superexpressão de bombas de efluxo, como CDR1, CDR2 e MDR1, regulados por mutações pontuais e fatores de transcrição, semelhantes aos mecanismos observados em *Candida albicans* (Pristov; Ghannoum, 2019). A pressão seletiva provocada pelo uso crescente de azóis e equinocandinas tem favorecido o surgimento de cepas resistentes, com mutações nos genes FKS1 e FKS2 aumentando a resistência às equinocandinas em isolados de *Candida glabrata* (Pristov; Ghannoum, 2019).

2.3.3 *Candida krusei*

Candida krusei é o patógeno menos comum dentro das cinco principais espécies de *Candida* responsáveis pela causa de candidíase (Pappas *et al.*, 2018). Entretanto, ainda representa uma causa importante de candidíase invasiva, associada a uma alta taxa de mortalidade que pode variar de 30% a 60% (Kountchou *et al.*, 2023). Trata-se de um patógeno particularmente prevalente em pacientes com neoplasias hematológicas, em indivíduos com neutropenia e em receptores de transplantes de medula óssea, especialmente aqueles submetidos a profilaxia prolongada com fluconazol (Jamiu; Albertyn; Sebolai; Pohl, 2020; Ben-Ami; Kontoyiannis, 2021).

Candida krusei possui resistência intrínseca ao fluconazol, que envolve um mecanismo não compreendido em sua totalidade, todavia, acredita-se ser resultado de uma combinação entre afinidade diminuída da enzima alvo (Erg11) e expressão constitutiva e induzível do transportador de efluxo Abc1 (Ben-Ami; Kontoyiannis, 2021).

A resistência antifúngica em *Candida krusei* não se limita aos azóis, pois a espécie também demonstra resistência às equinocandinas, atribuída a mutações pontuais nos genes FKS1 e FKS2, que resultam em alterações conformacionais na enzima glucano sintase, reduzindo a eficácia das equinocandinas (Jamiu; Albertyn; Sebolai; Pohl, 2020). Além disso, *Candida krusei* utiliza mecanismos adicionais de resistência, como a superexpressão de bombas de efluxo (CDR1 e CDR2) e desenvolvimento de vias de desvio para a biossíntese de esteróis, substituindo o ergosterol na membrana celular (Jamiu; Albertyn; Sebolai; Pohl, 2020).

2.3.4 *Candida parapsilosis*

Globalmente, *Candida parapsilosis* é a terceira principal causa de candidemia, ocupando um lugar importante no contexto de infecções hospitalares (Ben-Ami; Kontoyiannis, 2021), e particularmente no Brasil, é o segundo patógeno mais comum responsável pelos casos deste tipo de infecção. (Pappas *et al.*, 2018). É uma espécie menos virulenta em comparação com outras do mesmo gênero e está associada a taxas de mortalidade mais baixas (Pappas *et al.*, 2018). No entanto, continua a ser um problema significativo, especialmente em populações vulneráveis, como neonatos, receptores de transplantes e pacientes que necessitam de nutrição parenteral (Pristov; Ghannoum, 2019).

Em relação aos mecanismos de resistência, *Candida parapsilosis* apresenta resistência intrínseca às equinocandinas devido a polimorfismos naturais no gene FKS1,

que resultam em uma sensibilidade *in vitro* reduzida (Pristov; Ghannoum, 2019). Semelhante a outras espécies do gênero, a resistência aos azóis também é baseada nas mutações que ocorrem em ERG11 e regulação positiva das bombas de efluxo CDR1 e MDR1 (Ben-Ami; Kontoyiannis, 2021).

2.3.5 *Candida tropicalis*

Candida tropicalis é considerada a segunda espécie mais virulenta do gênero, apenas atrás de *Candida albicans* (Pristov; Ghannoum, 2019). A alta virulência de *Candida tropicalis* é atribuída a uma série de fatores, incluindo adesão a células epiteliais e endoteliais bucais, além de sua forte capacidade de formar biofilmes (Pristov; Ghannoum, 2019).

Em relação aos mecanismos de resistência, *Candida tropicalis* apresenta alta resistência aos azóis, especialmente ao fluconazol, devido a mecanismos semelhantes aos observados em outras espécies de *Candida*, como as mutações no gene Erg11 e expressão de bombas de efluxo (Pristov; Ghannoum, 2019). Embora a resistência às equinocandinas seja pouco expressiva, algumas mutações no gene FKS1 foram identificadas, resultando em leve diminuição da sensibilidade (Pristov; Ghannoum, 2019).

2.4 O GÊNERO *BACILLUS*

Após a descoberta da penicilina, diversos antimicrobianos derivados de bactérias surgiram para ampliar as opções terapêuticas disponíveis e superar infecções causadas por microrganismos resistentes. Muitos antimicrobianos disponíveis atualmente (estreptomicina, cloranfenicol, tetraciclina, neomicina, novobiocina, lincomicina e nistatina) para o tratamento de infecções bacterianas e fúngicas são produzidos por bactérias do gênero *Streptomyces*, porém não se restringe apenas a este gênero, pois importantes medicamentos são atribuídos ao gênero *Bacillus*, como a polimixina e a bacitracina (Procópio *et al.*, 2012).

O gênero *Bacillus* atualmente contém mais de 269 espécies e é composto por bacilos Gram-positivos aeróbios, catalase-positivos que são capazes de formar esporos em condições aeróbias (Koneman *et al.*, 2018). Com exceção de *Bacillus anthracis* e *Bacillus mycoides*, muitas espécies apresentam motilidade por meio de flagelos

(Koneman *et al*, 2018). Poucas espécies possuem relevância clínica, com destaque para *Bacillus anthracis*, representante patogênico mais importante do gênero e agente etiológico do antraz, que possui fortes correlações com bioterrorismo (Murray; Rosenthal; Pfaller, 2014). Outra espécie com importância clínica é *Bacillus cereus*, uma bactéria saprófita encontrada no solo que causa sérios problemas na indústria alimentar, pois é capaz de contaminar muitos produtos agrícolas, resultando em gastroenterite aguda autolimitada, mediada pela produção de enterotoxinas, normalmente após a ingestão de alimentos contaminados, como massas, arroz, produtos derivados do leite, grãos, especiarias, vegetais, carne e frango (Koneman *et al*, 2018). Todavia, *Bacillus cereus* também pode atuar como agente de infecções oportunistas localizadas e sistêmicas em hospedeiros imunocomprometidos e neonatos (Koneman *et al*, 2018).

2.4.1 Grupo *Bacillus subtilis*

As espécies originais do grupo *Bacillus subtilis* consistem em *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilis* e *Bacillus amylolicheticiens*, porém, a evolução de métodos de caracterização molecular, quimiotaxonômica e fisiológica desencadeou reavaliações e redescrições de numerosas espécies e subespécies novas (Caulier *et al.*, 2019). Atualmente, além das quatro espécies originais, outras bactérias compõem o grupo *Bacillus subtilis*, como *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus mojavensis*, *Bacillus velezensis*, *Bacillus paralicheniformis* e *Bacillus tequilensis* (Harwood *et al.*, 2018).

Estima-se que 4-5% do genoma do grupo *Bacillus subtilis* seja dedicado à produção de compostos antimicrobianos (Caulier *et al.*, 2019). De maneira geral, estes compostos podem ser classificados de acordo com sua via biossintética, dividindo-se em: peptídeos ribossômicos, enzimas antimicrobianas, policetídeos, peptídeos não ribossômicos e compostos voláteis (Caulier *et al.*, 2019).

Os peptídeos ribossômicos, também conhecidos como bacteriocinas, são derivados de precursores curtos e processados em compostos maduros por meio de modificações pós-traducionais, mediadas por diversas enzimas, resultando em uma ampla gama de estruturas químicas (Caulier *et al.*, 2019). As bacteriocinas ainda podem ser categorizadas em três classes, onde a classe I é composta por pequenos peptídeos modificados pós-traducionalmente, feitos de 19 a 38 aminoácidos, como os lantibióticos (Caulier *et al.*, 2019). As bacteriocinas de classe II também correspondem a pequenos peptídeos, com peso inferior a 10 kDa, lineares e não modificados, resistentes ao calor e

a mudanças de pH, enquanto as bacteriocinas de classe III são caracterizadas por serem moléculas grandes e termolábeis (Caulier *et al.*, 2019).

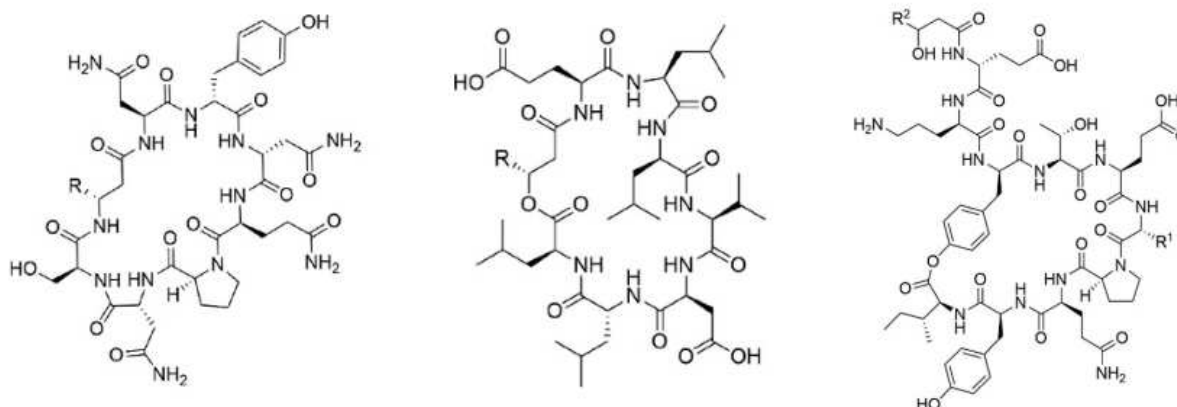
As enzimas antimicrobianas produzidas pelo grupo *Bacillus subtilis*, também chamadas de “enzimas degradadoras de parede celular”, são proteínas antimicrobianas com diferentes tipos de atividade lítica, que incluem celulasas, glucanases, proteases e quitinases (Caulier *et al.*, 2019).

Policetídeos são compostos bioativos sintetizados a partir de precursores de acil-CoA, como malonato e malonato de metila, e até o momento, sete famílias foram identificadas com base em seus esqueletos de carbono e estruturas características e dentro do grupo de *Bacillus subtilis*, são produzidos três policetídeos antimicrobianos: bacileno, difficidina e macrolactina, que demonstram atividade antibacteriana e antifúngica (Caulier *et al.*, 2019).

Os peptídeos não ribossômicos são moléculas que apresentam uma ampla diversidade estrutural, podendo ser lineares, cíclicas ou ramificadas, com destaque para os lipopeptídeos, divididos em quatro famílias conhecidas, das quais *Bacillus subtilis* é responsável pela produção de três: surfactinas, iturinas e fengicinas. Essas famílias compartilham características estruturais semelhantes, determinadas pela natureza e organização da fração peptídica e pela composição da cauda do ácido graxo (Caulier *et al.*, 2019).

As iturinas e fengicinas distinguem-se por sua expressiva atividade antifúngica, eficaz contra uma variedade de fungos patogênicos que afetam plantas e humanos, enquanto as surfactinas, embora conhecidas principalmente por suas atividades antivirais e antibacterianas, também demonstram, em alguns casos, capacidade de controlar patógenos fúngicos, como *Candida albicans* e *Fusarium oxysporum* (Caulier *et al.*, 2019).

Figura 1 - Estrutura química da iturina, surfactina e fengicina, respectivamente.



Fonte: Wang, Zhao e Zhang (2022)

Embora a síntese de surfactina tenha sido extensivamente investigada em *Bacillus subtilis*, outras espécies do grupo também produzem peptídeos não ribossômicos estruturalmente semelhantes, como a lichenisina, um lipopeptídeo cíclico sintetizado por *Bacillus licheniformis*, cuja estrutura é muito próxima à da surfactina (Harwood *et al.*, 2018).

O grupo *Bacillus subtilis* é capaz de produzir inúmeros compostos voláteis inorgânicos e orgânicos, que desempenham funções cruciais em um de seus principais habitats, o solo, onde participam de importantes processos, como a bioconversão da cadeia alimentar, os ciclos biogeoquímicos de elementos essenciais e diversas reações fisiológicas e metabólicas (Caulier *et al.*, 2019). Entre os compostos voláteis inorgânicos, encontram-se subprodutos do metabolismo primário, como CO₂, CO, H₂, HCN e H₂S, enquanto os compostos voláteis orgânicos são caracterizados por estruturas pequenas, baixa massa molecular, alta pressão de vapor, baixo ponto de ebulição e um caráter lipofílico (Wang; Zhao; Zhang, 2022). Esses compostos orgânicos, que podem ser classificados como hidrocarbonetos ou carboidratos, apresentam, em sua maioria, atividade fungicida, embora alguns também demonstrem propriedades antibacterianas e nematocidas (Caulier *et al.*, 2019).

2.4.2 Potencial antimicrobiano do gênero *Bacillus*

Microrganismos que vivem no solo e formam esporos, como os do gênero *Bacillus*, estão entre os mais eficientes produtores de compostos antimicrobianos, característica vinculada ao processo de esporulação, que é desencadeado em resposta ao estresse e à carência de nutrientes, envolvendo uma diferenciação morfológica que consome recursos energéticos e nutricionais, que resulta no sacrifício de uma parcela significativa da população bacteriana para sustentar a formação de esporos, sendo que, no caso das espécies de *Bacillus*, apenas cerca de 10% das células bacterianas formam esporos, enquanto as demais são lisadas para liberar nutrientes essenciais, os quais, no entanto, também podem beneficiar competidores que habitam o mesmo ambiente, razão pela qual essas bactérias produzem metabólitos antimicrobianos para restringir o crescimento de microrganismos concorrentes durante o estágio mais vulnerável de sua esporulação (Harwood *et al.*, 2018).

As espécies de *Bacillus* abrigam grande potencial para o desenvolvimento de futuros antimicrobianos. Muitas espécies de *Bacillus* podem produzir uma miríade de substâncias com atividade antimicrobiana (Mingmongkolchai; Panbangred, 2018). Esses compostos apresentam estruturas químicas diversas e podem ser encontrados na forma de lipopeptídeos, bacteriocinas, glicopeptídeos e peptídeos cíclicos (Sumi *et al.*, 2015).

Em amostras de solo, Abednego e Silago (2023) isolaram 16 espécies do gênero *Bacillus*, das quais uma, pertencente ao complexo *Bacillus altitudinis/pumilus*, apresentou atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas, incluindo *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA). Outro estudo, elaborado por Barbosa *et al.* (2005) constataram que cepas de *Bacillus subtilis*, isoladas a partir de amostras fecais de frango de corte, exibiram atividade inibitória contra diferentes espécies de bactérias Gram-positivas, como *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Clostridium perfringens*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*.

O espectro de atividade antimicrobiana do gênero *Bacillus* não se limita apenas às bactérias. Duas espécies de *Bacillus* isoladas de ambientes marinhos, associadas a algas e invertebrados, foram capazes de exercer atividade antifúngica contra cepas de *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* (Amraoui *et al.*, 2014). Reforçando as propriedades antifúngicas do gênero, Song *et al.* (2013) demonstraram que seis cepas isoladas de sistemas de manguezais, da espécie *Bacillus amyloliquefaciens* exerceram atividade antifúngica contra uma cepa de *Candida albicans* resistente a anfotericina B, proveniente de amostra clínica, além de outras espécies de fungos, como *Candida tropicalis*, *Yarrowia lipolytica* e *Metschnikowia bicuspidata*.

Os estudos citados isolaram espécies de *Bacillus* de amostras diversificadas. Isto é possível pois estas bactérias são, em sua maioria, ubíquas no ambiente e podem estar presentes em poeira, solo, água e materiais de origem vegetal e animal (Koneman *et al*, 2018). A relação do gênero *Bacillus* com os animais ocorre pois estas bactérias podem ser isoladas do trato gastrointestinal e fezes de diferentes animais, incluindo galinhas, porcos, ruminantes e animais aquáticos, devido à ingestão de alimentos contaminados com bactérias presentes no solo (Mingmongkolchai; Panbangred, 2018).

A prática de reutilização de cama de aviário pode ter relação com a redução de prevalência de *Salmonella*, devido à exclusão competitiva ou antagonismo bacteriano de outros microrganismos presentes neste ambiente (Gutierrez; Schneider, 2022). Um estudo avaliando o potencial de exclusão competitiva de um microbioma de cama de aviário reutilizado constatou que cepas de *Bacillus subtilis* originários destas amostras, que foram identificadas durante o andamento do estudo, reduziram significativamente o crescimento de *Salmonella enterica* sorovar Heidelberg (Bucher *et al.*, 2020).

3 JUSTIFICATIVA

Em 2001 a OMS publicou o documento intitulado Estratégia Global para Contenção de Resistência Antimicrobiana, visando fornecer intervenções incisivas sobre o surgimento e propagação da resistência antimicrobiana. Entre as intervenções propostas, a publicação destacou a importância de incentivar a cooperação entre indústria, órgãos governamentais e instituições acadêmicas na busca por novos medicamentos, pois desde aquela época, essa busca é uma questão essencial, dada a situação emergencial da resistência antimicrobiana entre os agentes patogênicos humanos. Para atingir este objetivo, parcerias público-privadas entre empresas e instituições acadêmicas vêm sendo estimuladas para acelerar a descoberta de medicamentos com propriedades antimicrobianas. Reforçando a urgência do desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos para o enfrentamento de infecções fúngicas, a OMS, em 2022, publicou uma lista de patógenos fúngicos prioritários em resposta à crescente ameaça dessas infecções, agravada pelos problemas existentes e emergentes de resistência. Esse documento foi direcionado, em especial, à indústria farmacêutica e de diagnósticos, instituições acadêmicas, centros de pesquisa em saúde pública e parcerias público-privadas que investem na pesquisa básica e no desenvolvimento de novas terapias antifúngicas. Entre os principais objetivos deste documento, tem-se a necessidade de estabelecer prioridades claras para pesquisa e desenvolvimento, visando alinhar os recursos financeiros e os investimentos com as demandas da saúde pública, além de promover a cooperação internacional para a descoberta de novas abordagens terapêuticas e a otimização das já disponíveis.

Em consonância com a proposta de estabelecer conexões entre empresas e o ambiente acadêmico, a viabilidade deste estudo foi possível por meio de uma parceria entre a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) com a Biotecnal, uma empresa produtora e comercializadora de produtos biotecnológicos, localizada em Toledo, no estado do Paraná, através do programa MAI/DAI do CNPq.

Desde o início dos anos 2000, poucas novas classes de antimicrobianos foram efetivamente introduzidas no mercado, destacando-se na década de 2000 as oxazolidinas, lipopeptídeos e pleuromutilinas, enquanto na década de 2010 foram introduzidas as lipiarmicinas e diarilquinolinas (Hutchings; Truman; Wilkinson, 2019). Junto a isto, tem-se um arsenal limitado de antifúngicos para uso clínico, composto por três classes principais: azóis, polienos e equinocandinas (Ben-Ami; Kontoyiannis, 2021).

Neste contexto, a investigação de microrganismos capazes de exercer atividade antimicrobiana contra diferentes espécies de bactérias e fungos mostra-se como uma valiosa fonte de potenciais fármacos para uso clínico e agropecuário, de forma a ampliar as possibilidades terapêuticas e retardar a crescente resistência antimicrobiana. Portanto, em virtude de sua composição extremamente heterogênea e favorável para a existência de bactérias do gênero de interesse, este trabalho teve como objetivo investigar a atividade antimicrobiana de espécies de *Bacillus* provenientes de amostras de cama de aviário contra fungos patogênicos importantes para a saúde humana.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a atividade antimicrobiana de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* isolados de cama de aviário contra espécies de *Candida*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a atividade antimicrobiana de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* contra *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*, utilizando a técnica de estriamento em *cross-streak*.
- Investigar a atividade antimicrobiana de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* contra espécies de *Candida* que demonstraram inibição na triagem primária, utilizando a técnica de poços em placas.

5 METODOLOGIA

O trabalho proposto foi realizado no Laboratório de Microbiologia Molecular Aplicada (MiMA) da Universidade Federal de Santa Catarina. As espécies de *Bacillus* utilizadas neste trabalho integram o projeto intitulado “Prospecção e caracterização de microrganismos com potencial biotecnológico com impacto na Saúde Única”, que visa a prospecção e caracterização de bactérias do respectivo gênero, com propósito de explorar o seu potencial biotecnológico na produção de compostos com propriedades antimicrobianas que tenham aplicações pertinentes à Saúde Única, aplicando novas tecnologias como a genômica, metagenômica e proteômica. Os isolados de espécies de *Bacillus* foram previamente prospectados de amostras de cama de aviário no período de janeiro a abril de 2024, como descrito no item 5.1. Neste trabalho, a investigação da atividade antimicrobiana foi executada através de duas técnicas, realizadas em duplicata, a fim de realizar triagem primária e secundária.

5.1 PROSPECÇÃO DAS AMOSTRAS E OBTENÇÃO DOS ISOLADOS

Dez amostras de cama de aviário foram prospectadas em três meios de cultura distintos, em busca de diferentes espécies de *Bacillus* com potencial atividade antimicrobiana. A prospecção das amostras foi realizada a partir de duas metodologias distintas, com intuito de ampliar a quantidade de diferentes espécies isoladas.

O primeiro tipo de prospecção, adaptado de Barbosa *et al.* (2005), foi iniciado com a adição de 1 g de amostra, em um tubo Falcon de 50 mL contendo 10 mL de solução salina. As amostras foram submetidas à agitação em *shaker* por um período de 2 horas. Após esse tempo, esperou-se a sedimentação da mistura, sendo retirado aproximadamente 1,5 mL do sobrenadante, o qual foi transferido para um *eppendorf* de 2 mL. Em seguida, esse sobrenadante foi submetido a um tratamento térmico a 80°C por 12 minutos. Posteriormente, foram realizadas diluições em série nas concentrações de 10^{-2} e 10^{-5} , utilizando tubos de 10 mL com salina como eluente. Para a diluição de 10^{-2} , transferiu-se 1 mL do sobrenadante da amostra para um tubo com 9 mL de salina, obtendo-se uma diluição 10^{-1} , e, em seguida, foi adicionada 1 mL dessa solução a outro tubo com 9 mL de salina, resultando na diluição desejada de 10^{-2} . O mesmo processo foi repetido para a diluição de 10^{-5} , partindo da diluição 10^{-2} até alcançar a concentração final. Após as diluições, semearam-se 100 microlitros das amostras em placas contendo

meio TSA ou TSA alcalinizado, utilizando uma alça de Drigalski. Na segunda etapa, após 24 horas de incubação a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, foram selecionadas colônias com morfologias distintas. Cada colônia identificada foi novamente semeada em meio TSA (*Tryptone Soy Agar*) ou TSA alcalinizado e, após mais 24 horas de incubação, foi realizada a coloração de Gram para confirmar a presença de bactérias Gram-positivas, correspondentes a morfologia do gênero *Bacillus*. As colônias foram classificadas conforme sua morfologia, armazenadas em criotubos contendo 1 mL de BHI (*Brain Heart Infusion*) com 15% de glicerol a -80°C , e atribuiu-se um código específico para cada uma, seguindo a nomenclatura: 24VMêsMeioAmostraC(n) (exemplo: 24V01TSA03C3).

O segundo tipo de prospecção, adaptado de Wakisaka e Koizumi (1982), teve objetivo de isolar espécies de *Bacillus* consideradas sub representados. Algumas espécies de *Bacillus* crescem mais lentamente em relação a outras, portanto, em meios convencionais, essas espécies se perdem na competição por nutrientes para o crescimento. A segunda prospecção, utilizando caldo de germinação (1.0% glicose, 0.5% casaminoácidos, 0.3% extrato de carne, 0.1% extrato de levedura, e 0.1 DL-alanina, pH 6.8) e ágar Gly-IM (0.2% amido solúvel, 0.2% glicerol, 0.25%, polipeptona, 0.25% extrato de levedura, 0.25% extrato de carne, 0.3% NaCl e 1.25% agar, pH 6.8) tem o intuito de fornecer nutrientes específicos que favoreçam o crescimento dessas espécies consideradas sub representadas, para que estas possam ser isoladas e caracterizadas, em detrimento das outras espécies que apresentam um crescimento mais acelerado em meios convencionais.

O procedimento foi iniciado com a adição de 0,5 g da amostra, em um tubo de 10 mL, contendo 5 mL de solução salina. A mistura foi agitada por 1 minuto e, em seguida, submetida a uma câmara de anaerobiose por 30 minutos. Após essa etapa, a amostra foi aquecida a 65°C durante 30 minutos. Posteriormente, foi feita a mistura de 1 mL da suspensão da amostra com 1 mL de caldo germinativo. A mistura resultante foi incubada sob agitação a 90 RPM, a uma temperatura de 38°C , por um período de 2 a 3 horas. Em seguida, a amostra foi aquecida novamente a 65°C por 10 minutos. Após o aquecimento, a suspensão foi resfriada, e as diluições necessárias foram realizadas nas concentrações de 10^{-2} e 10^{-3} . Por fim, semeou-se 0,1 mL das diluições em ágar Gly-IM (*glycerol isolation medium*), e as amostras foram incubadas a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por um período de 24 horas.

Assim como na prospecção anterior, a segunda etapa busca as colônias com morfologias distintas, para serem semeadas isoladamente em Gly-IM ágar. Após 24

horas de incubação, a identificação presuntiva foi realizada através da coloração de Gram, um código foi atribuído, seguindo o mesmo padrão da prospecção anterior e o armazenamento em criotubos contendo BHI com 15% de glicerol, a -80°C, foi realizado.

5.2 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

Os isolados foram identificados de forma automatizada pelo equipamento BD™Bruker MALDI Biotyper™ Sirius One, por meio da técnica de Maldi-Tof (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Light*), que consiste na ionização para identificação de proteínas da bactéria.

5.3 TRIAGEM PRIMÁRIA: CROSS-STREAK

A triagem primária para investigar a atividade antimicrobiana de 35 isolados das espécies de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* foi adaptada de Prashanthi *et al.* (2021) e envolveu cinco microrganismos de interesse. Tratam-se de fungos leveduriformes, escolhidos a partir da lista de fungos prioritários da OMS: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e *Candida krusei*. Cada espécie foi contemplada com uma cepa correspondente, sendo 4 cepas ATCC (*Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*) e uma cepa clínica (*Candida glabrata*). Utilizando um inóculo ajustado ao padrão 0,5 da escala de McFarland, as espécies de *Bacillus* foram estriadas em linha reta no centro das placas de ágar Sabouraud previamente esterilizadas. As placas inoculadas foram incubadas a 30°C ± 2°C por 24 horas para permitir o crescimento da colônia central de *Bacillus*. As cepas de *Candida* utilizadas no estudo foram mantidas em tubos de ágar Sabouraud a uma temperatura de 4-8°C com renovação mensal para garantir sua viabilidade. Mensalmente, novas culturas em tubos de ágar Sabouraud eram preparadas a partir das cepas armazenadas em BHI com glicerol a -20°C. Esse processo envolveu o cultivo prévio das cepas em caldo BHI a 37°C por 24 horas, seguido da semeadura em tubos de ágar Sabouraud, que eram então armazenados em temperatura de refrigeração (4-8°C). Para utilização nos experimentos, as culturas eram previamente repicadas em ágar BHI, obtendo-se colônias com 24 horas de crescimento. Após o primeiro período de incubação, as espécies de levedura foram estriadas perpendicularmente à linha de crescimento de *Bacillus* nas mesmas placas de ágar Sabouraud. Esses microrganismos

também foram preparados com inóculo ajustado ao padrão 0,5 da escala de McFarland. As placas foram novamente incubadas a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por mais 48 horas. A medida das zonas de inibição foi realizada utilizando uma régua, os resultados foram registrados em milímetros. Para assegurar que as inibições encontradas não eram decorrentes de erros do manipulador, problemas no inóculo, ou com o preparo do meio de cultura, uma placa contendo apenas as estrias das espécies de *Candida* foi utilizada como controle em cada experimento.

5.4 TRIAGEM SECUNDÁRIA: POÇOS EM PLACA (*Well-diffusion*)

A triagem secundária, adaptada de Amraoui *et al.* (2014), contemplou as três espécies que foram inibidas na triagem primária: *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida parapsilosis*. Os isolados de *Bacillus* que apresentaram atividade na triagem primária foram cultivados em caldo nutriente a 37°C por 4 dias. Após o período de cultivo dos isolados de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*, placas de ágar Saboraud previamente perfuradas com um furador estéril foram utilizadas. Assim como na triagem primária, as cepas de *Candida* foram previamente repicadas em ágar BHI, para obtenção de colônias com 24 horas de crescimento. As placas de ágar Saboraud foram semeadas, em três direções, com as espécies de *Candida*, utilizando um inóculo ajustado ao padrão 0,5 da escala de McFarland. Após o cultivo, uma alíquota de 20 μL do caldo nutriente foi aplicada nos poços de 5 mm de diâmetro nas placas de ágar Saboraud previamente inoculadas com as espécies de *Candida*. Para o controle negativo, aplicou-se a mesma alíquota do caldo nutriente puro em um poço. Antes da incubação, as placas foram armazenadas em geladeira, a 4°C , por 2 horas. Em seguida, as placas foram incubadas a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Após o período de incubação, os halos de inibição formados ao redor dos poços foram medidos em milímetros, utilizando uma régua.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Metabólitos antimicrobianos representam uma fonte valiosa de produtos naturais, e o gênero *Bacillus* destaca-se por sua ampla aplicação antifúngica, graças à sua excelente biossegurança e forte resistência (Wang; Zhao; Zhang, 2022). Entre as substâncias bioativas produzidas por *Bacillus*, destacam-se lipopeptídeos, enzimas, bacteriocinas, policetídeos e compostos voláteis, que possuem propriedades antifúngicas importantes, especialmente no controle de fungos patogênicos (Wang; Zhao; Zhang, 2022). Além disso, os membros do gênero *Bacillus* são amplamente utilizados na síntese de metabólitos essenciais para diversos tipos de indústrias, incluindo antimicrobianos, aminoácidos, enzimas e açúcares, com aplicações significativas nos setores medicinal, agrícola, alimentício e cosmético (P *et al.*, 2021).

Dos 35 isolados de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* selecionados, 11 não apresentaram qualquer atividade na triagem primária, todos pertencentes à espécie *Bacillus licheniformis*. Dos 24 isolados que demonstraram atividade, 23 foram identificados como *Bacillus subtilis* e apenas um como *Bacillus licheniformis*. Em relação às espécies de *Candida* avaliadas, nenhum isolado exibiu atividade contra *Candida krusei* e *Candida tropicalis* na triagem inicial, motivo pelo qual essas espécies não foram incluídas na triagem secundária. No entanto, praticamente todos os isolados com potencial antimicrobiano na triagem primária demonstraram atividade antimicrobiana contra as três espécies restantes: *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida parapsilosis*, conforme ilustrado na Figura 2. Apenas um isolado apresentou atividade restrita a *Candida glabrata* e *Candida parapsilosis*, sem inibição de *Candida albicans*. Os perfis de atividade entre os isolados mostraram-se bastante similares, o que era esperado, considerando que tratam-se de espécies do mesmo grupo (Apêndice 1). Na triagem secundária, os 24 isolados mantiveram a atividade antimicrobiana contra as três espécies remanescentes de *Candida* (Figura 3, Apêndice 2).

Figura 2 - Inibição de espécies de *Candida* na triagem primária pelo método de *cross-streak*



Legenda: (A) inibição de *Candida parapsilosis*, (B) inibição de *Candida albicans*, (C) inibição de *Candida glabrata*, (D) *Candida tropicalis* e *Candida krusei* (E) com ausência de inibição
Fonte: autor (2024)

Figura 3 - Inibição contra *Candida glabrata* (esquerda), *Candida parapsilosis* (centro) e *Candida albicans* (direita) por três isolados de *Bacillus subtilis* pelo método de poços em placa.

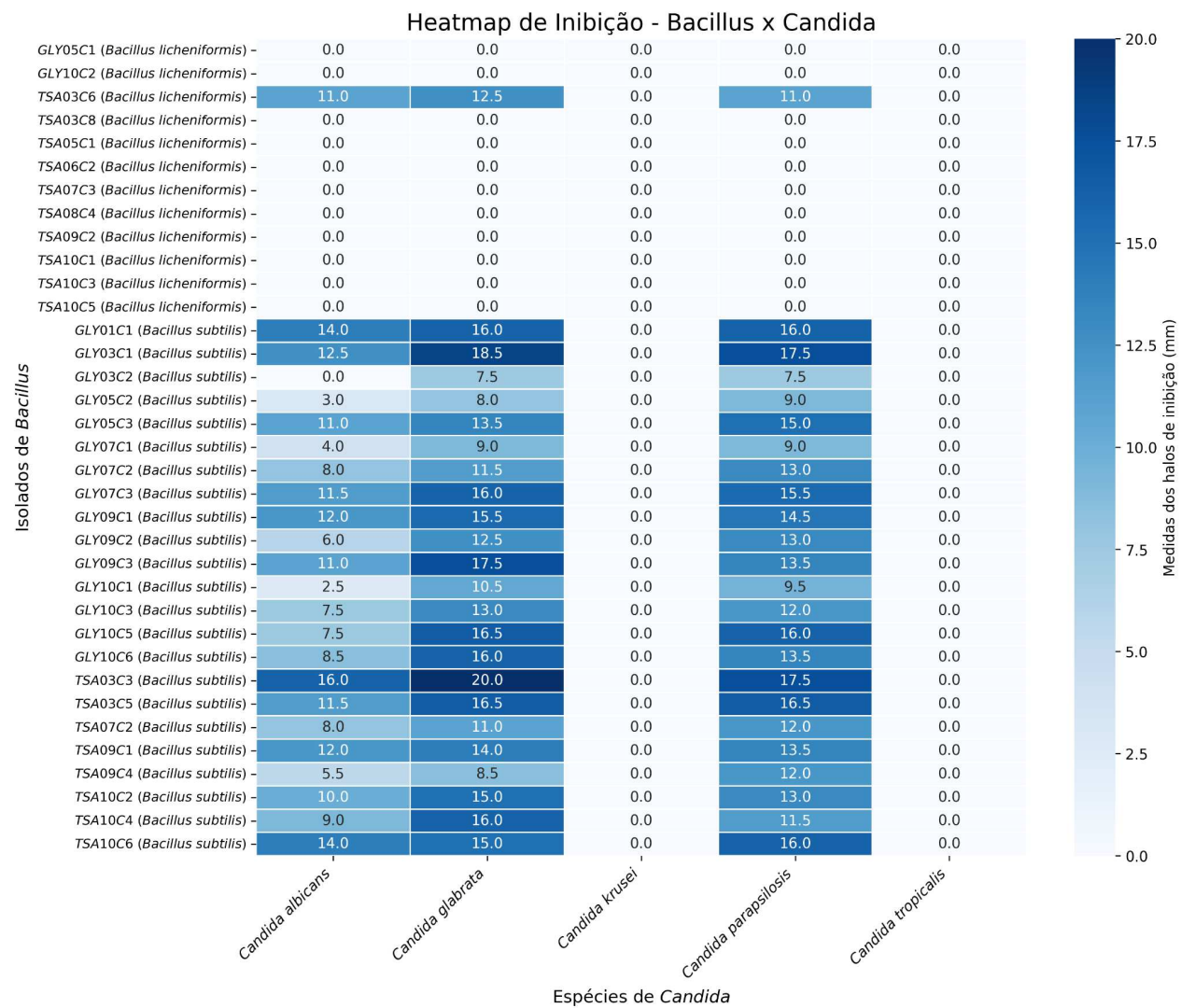


Fonte: autor (2024)

Em busca de elucidar a diferença entre os perfis de atividade das espécies de *Candida*, foram construídos dois *heatmaps*, referentes a triagem primária (Figura 4) e a triagem secundária (Figura 5), nos quais os valores apresentados correspondem a média aritmética dos experimentos feitos em duplicata e a intensidade crescente da cor azul indica o aumento dos valores de inibição. No *heatmap* de triagem primária

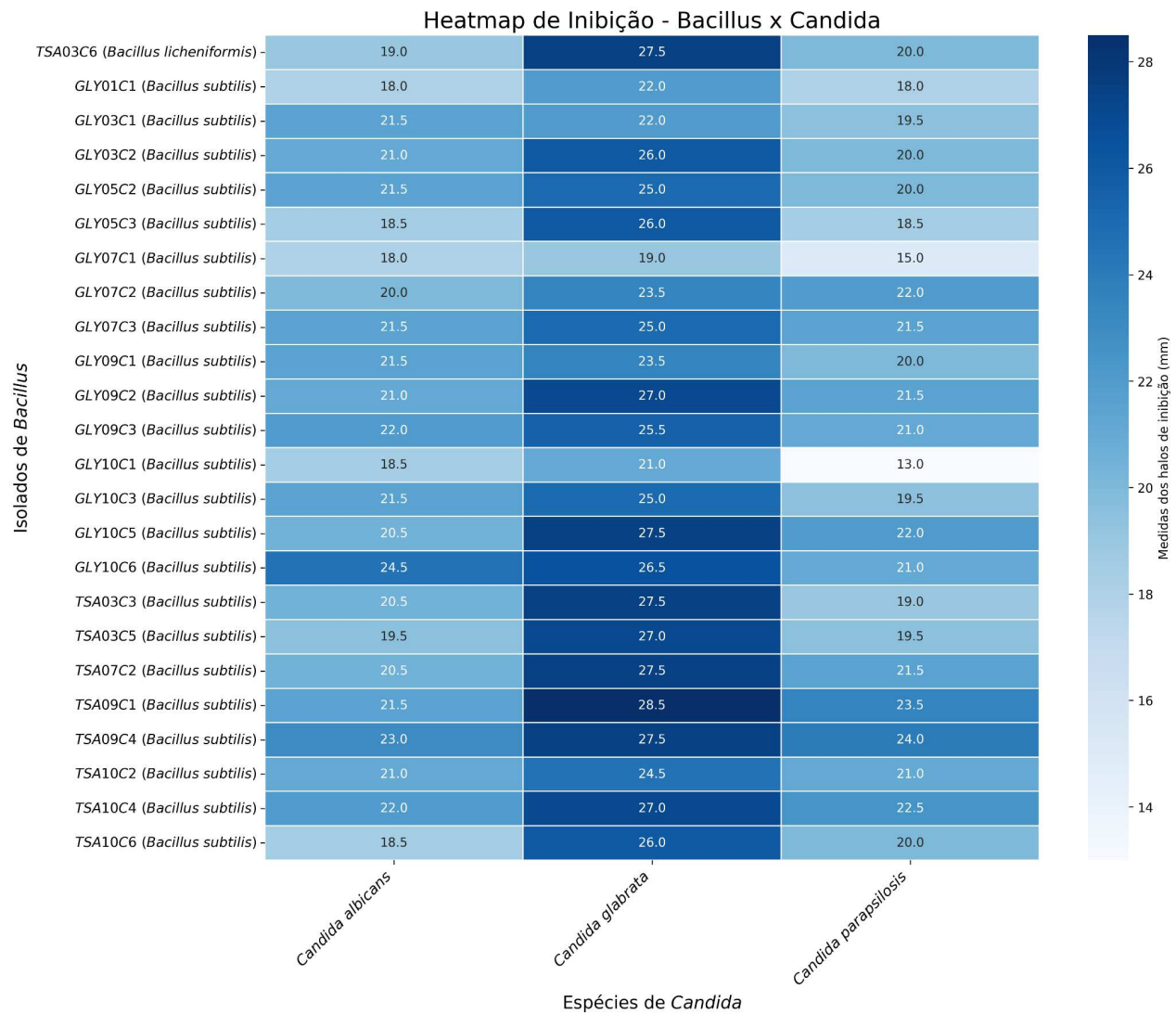
observa-se um desempenho levemente superior de inibição contra *Candida glabrata* em relação às demais espécies, todavia, no *heatmap* da triagem secundária, as diferenças dos resultados tornam-se mais evidentes, destacando um perfil melhor de atividade contra *Candida glabrata*, seguido de *Candida parapsilosis* e *Candida albicans*.

Figura 4 - *Heatmap* das médias, em milímetros, de inibição da triagem primária pelo método de *cross-streak*.



Fonte: autor (2024)

Figura 5 - *Heatmap* das médias, em milímetros, de inibição da triagem secundária pelo método de difusão de poços em placa.



Fonte: autor (2024)

A atividade antifúngica do grupo *Bacillus subtilis* e outras espécies do gênero contra espécies de *Candida* já foi relatada na literatura por diversos autores, que empregaram diferentes metodologias. Gharieb, Rizk e Elfeky (2024) constataram que três cepas de *Bacillus subtilis* demonstraram forte efeito inibitório contra *Candida albicans* pela técnica de difusão de poços em placas. As cepas 1, 2 e 3 apresentam halos de 30 mm, 19 mm e 14 mm respectivamente, todos valores acima do controle positivo (itraconazol), que teve um halo de 13,67 mm. El-Housseiny *et al.* (2021) realizaram triagem primária e secundária, através do método de *cross-streak* e difusão de poços em placa, em bactérias provenientes do solo, e prospectou um isolado de *Bacillus subtilis* que apresentou, a partir da triagem secundária, uma zona de inibição de

20 mm contra *Candida albicans*, corroborando o potencial antifúngico de *Bacillus subtilis* e os resultados obtidos neste trabalho.

Apesar dos esforços em busca de atividade inibitória ser direcionado a *Candida albicans*, o gênero *Bacillus* também é explorado para combater as espécies de *Candida* não-*albicans*. Spaggiari *et al.* (2024) demonstraram que a espécie *Bacillus coagulans* possui amplo poder inibitório frente a *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*, com uma taxa média de inibição de 93,6% e 98,9% respectivamente. O resultado foi obtido quantificando, em ágar Sabouraud suplementado com cloranfenicol, as unidades formadoras de colônia (UFC) das espécies de *Candida* que restaram da incubação em conjunto de *Bacillus coagulans*.

Os resultados obtidos neste trabalho que sugerem a atividade antifúngica de *Bacillus subtilis* contra *Candida glabrata* também foram evidenciados por outros autores. Madduri, Rudramurthy e Roy (2024) demonstraram, a partir de um ensaio de citometria de fluxo, os efeitos de lipopeptídeos obtidos de sobrenadante livre de células proveniente de *Bacillus subtilis* e constataram que este composto foi capaz de ocasionar ruptura da membrana de *Candida glabrata*, de forma diretamente proporcional a concentração.

A proposta deste trabalho consiste em demonstrar a presença ou ausência de atividade antimicrobiana de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* contra espécies de *Candida*, através de técnicas de triagem, todavia, possui a limitação em relação a caracterização dos possíveis compostos antimicrobianos envolvidos, e consequentemente, dos mecanismos responsáveis pela atividade antifúngica exercida nas espécies de *Candida* contempladas. Alguns autores buscaram correlacionar a atividade antimicrobiana diretamente a um grupo ou tipo específico de metabólito. P *et al.* (2021) descobriram que a atividade antifúngica de *Bacillus firmus*, evidenciada em duas etapas do método de disco difusão (impregnado com sobrenadante livre de células e extrato purificado de proteína antimicrobiana), era responsável por uma proteína denominada subtilisina A, também produzida por *Bacillus subtilis*, que gerou halos de inibição de 15 mm para *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*. Zhao *et al.* (2016) também realizaram ensaios de disco difusão, aplicando depósito centrifugado de *Bacillus subtilis* oriundos de probióticos comerciais e obteve forte atividade antimicrobiana contra *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*, posteriormente confirmando a presença de iturina A, um lipopeptídeo conhecido por sua atividade antifúngica, no sobrenadante de *Bacillus subtilis*.

Devido a diversidade de compostos antimicrobianos produzidos por *Bacillus*, provenientes de diferentes vias biossintéticas, com estruturas químicas heterogêneas, pode-se esperar que a inibição antifúngica exercida sobre *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida parapsilosis* seja resultado de mecanismos de ação variados exercidos por diferentes tipos de moléculas.

Iturinas e fengicinas são lipopeptídeos que exercem seu mecanismo de ação a partir da alteração de tensão superficial da membrana celular fúngica, levando a formação de microporos e extravasamento de íons importantes, resultando em morte celular (Wang; Zhao; Zhang, 2022). Aliado a isto, temperaturas abaixo de 37°C, em ambientes com presença de oxigênio, favorecem a produção de iturinas e fengicinas (Caulier *et al.*, 2019). Essas condições convergem com as condições utilizadas durante a triagem primária e secundária e poderia justificar a presença de iturinas e fengicinas promovendo a inibição das espécies de *Candida*.

A nisina A, uma bacteriocina produzida por *Bacillus*, de modo semelhante aos lipopeptídeos, também apresenta efeito antifúngico inibindo a síntese da parede celular fúngica e causando perfurações na membrana celular (Wang; Zhao; Zhang, 2022). Outros mecanismos de inibição envolvendo a parede celular fúngica podem ser decorrentes das enzimas antimicrobianas produzidas pelo grupo *Bacillus subtilis*, especialmente quitinase e glucanase, visto que a quitina e a glucana são os principais constituintes da parede celular fúngica (Caulier *et al.*, 2019).

Além dos mecanismos propostos na literatura para os metabólitos antimicrobianos produzidos pelo grupo *Bacillus subtilis* e outras espécies do gênero, é igualmente relevante considerar as diferenças entre as espécies de *Candida* testadas, a fim de expandir a compreensão acerca da diferença entre os resultados observados na triagem primária e secundária.

Candida glabrata apresenta células com tamanhos menores que variam de 1 a 4 µm, em comparação a *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*, que apresentam tamanhos que podem variar de 4 a 6 µm e 2,5 a 4 µm respectivamente (Silva *et al.*, 2012). Somado a isto, *Candida glabrata* é incapaz de secretar enzimas protease (Pristov; Ghannoum, 2019), e a sua formação de biofilme é diminuída quando é cultivada em meios de cultura ricos (Silva *et al.*, 2012), o que poderia facilitar a atuação de alguns compostos antimicrobianos produzidos por *Bacillus*, como as enzimas antimicrobianas ou lipopeptídeos.

Candida parapsilosis expressa menos enzimas protease em comparação a *Candida albicans* (Branco; Miranda; Rodrigues, 2023). A formação de biofilmes também é limitada, com matrizes mais finas e menos estruturadas (Silva *et al.*, 2012). Isso ocorre pois o biofilme de *Candida parapsilosis* não forma hifas verdadeiras, logo, é composto apenas de blastoconídios e pseudo-hifas, que ocupam um volume menor em comparação com outras espécies do gênero (Branco; Miranda; Rodrigues, 2023). No entanto, *Candida albicans* pode mudar sua morfologia e existir na forma de levedura, pseudo-hifa e hifa verdadeira (Pristov; Ghannoum, 2019).

Candida albicans é a espécie mais frequentemente associada à formação de biofilmes e seus efeitos patogênicos são mais observados nesta espécie de *Candida* (Pristov; Ghannoum, 2019; Czajka *et al.*, 2023). Biofilmes são populações microbianas incorporadas em uma matriz polimérica extracelular (Jamiu; Albertyn; Sebolai; Pohl, 2020). Esta matriz é composta por polissacarídeos e proteínas, que podem ser produzidas por leveduras no local de infecção para conferir proteção contra antimicrobianos e até mesmo, o sistema imunológico do hospedeiro (Czajka *et al.*, 2023).

O biofilme é um importante fator de virulência para diversas espécies de *Candida*, pois devido a sua formação, a penetração de substâncias através da matriz torna-se limitada, resultando em uma resistência significativa a terapias antifúngicas (Silva *et al.*, 2012). As características do biofilme que estabelecem a resistência antifúngica incluem: proteção física, aumento de densidade celular da comunidade microbiana e secreção vesicular extracelular (Czajka *et al.*, 2023). Neste contexto, *Candida albicans* teria vantagem em relação a *Candida glabrata* e *Candida parapsilosis*, pois a formação de biofilme teria conferido mais proteção diante dos metabólitos antimicrobianos secretados pelos isolados de *Bacillus*, resultando em valores de inibição relativamente menores.

A ausência de atividade antimicrobiana contra *Candida krusei* e *Candida tropicalis* também pode ser relacionada com fatores relacionados à espécie, de maneira análoga aos fatores que contribuem para a presença de atividade nas demais espécies testadas. *Candida krusei* produz diversos fatores de virulência, entre eles, a formação de biofilmes e a produção de proteínas e fosfolipases (Kountchou *et al.*, 2023). No mesmo estudo em que foram obtidos resultados de atividade antimicrobiana de *Bacillus subtilis* contra *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*, Zhao *et al.* (2016) não obteve resultados de inibição notáveis contra *Candida krusei*.

Candida tropicalis é considerada a segunda espécie mais virulenta do gênero, apenas atrás de *Candida albicans*, pois é capaz de secretar diversas enzimas líticas, como proteinases e fosfolipases, além de também ser uma forte espécie produtora de biofilme (Pristov; Ghannoum, 2019). Portanto, a soma destas condições atreladas a *Candida krusei* e *Candida tropicalis* podem ter influenciado a atuação dos metabólitos antimicrobianos secretados nos meios de cultura por *Bacillus* durante a triagem primária, resultando na ausência de atividade contra essas espécies.

7 CONCLUSÃO

Este trabalho teve como objetivo investigar a atividade antimicrobiana de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* contra *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* e *Candida tropicalis*, por meio de triagens primária e secundária, utilizando as técnicas de *cross streak* e poços em placa, respectivamente. Os resultados obtidos demonstraram atividade antimicrobiana contra *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida parapsilosis*, inicialmente identificada na triagem primária e confirmada na triagem secundária, reforçando o potencial de espécies do gênero *Bacillus* como agentes alternativos para o desenvolvimento de novos fármacos capazes de combater infecções fúngicas.

Esses resultados são particularmente relevantes diante da crescente resistência aos antimicrobianos e da necessidade de identificar novas estratégias terapêuticas, sobretudo contra infecções fúngicas causadas por espécies de *Candida*. Contudo, é importante reconhecer que este trabalho avalia apenas a atividade antimicrobiana de forma qualitativa, sem explorar os metabólitos específicos e seus mecanismos correspondentes responsáveis pela atividade antimicrobiana relatada.

Futuras pesquisas podem investigar, de forma mais detalhada, os compostos antimicrobianos envolvidos nesse processo, ampliando o entendimento sobre os mecanismos de ação e o potencial terapêutico de *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*, especialmente diante das espécies de *Candida* não *albicans*, em uma tentativa de contribuir para a base científica do desenvolvimento de novos fármacos antimicrobianos e para o avanço significativo no enfrentamento da resistência aos medicamentos atualmente disponíveis.

REFERÊNCIAS

- ABEDNEGO, Reuben N.; SILAGO, Vitus. Antibacterial activity of soil-isolated *Bacillus altitudinis/pumilus* complex against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from Mwanza, Tanzania. **African Journal Of Laboratory Medicine**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 1-5, 18 jul. 2023. Disponível em: <https://ajlmonline.org/index.php/AJLM/article/view/2167>. Acesso em: 20 mar. 2024.
- AMRAOUI, B. El *et al.* Anti- *Candida* and anti- *Cryptococcus* antifungal produced by marine microorganisms. **Journal de Mycologie Médicale**, [S.L.], v. 24, n. 4, p. 149-153, dez. 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1156523314001826?via%3Dihub>. Acesso em: 26 abr. 2024.
- ANTUNES, Patrícia; NOVAIS, Carla; PEIXE, Luísa. Food-to-Humans Bacterial Transmission. **Microbiology Spectrum**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 1-26, 16 jan. 2020. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/microbiolspec.mtbp-0019-2016>. Acesso em: 09 abr. 2024.
- BARBOSA, Teresa M. *et al.* Screening for *Bacillus* Isolates in the Broiler Gastrointestinal Tract. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 71, n. 2, p. 968-978, fev. 2005. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aem.71.2.968-978.2005>. Acesso em: 15 abr. 2023.
- BEN-AMI, Ronen; KONTOYIANNIS, Dimitrios P.. Resistance to Antifungal Drugs. **Infectious Disease Clinics Of North America**, [S.L.], v. 35, n. 2, p. 279-311, jun. 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0891552021000131?via%3Dihub>. Acesso em: 18 abr. 2024.
- BHATTACHARYA, Somanon; SAE-TIA, Sutthichai; FRIES, Bettina C.. Candidiasis and Mechanisms of Antifungal Resistance. **Antibiotics**, [S.L.], v. 9, n. 6, p. 312, 9 jun. 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-6382/9/6/312>. Acesso em: 27 out. 2024.
- BRANCO, Joana; MIRANDA, Isabel M.; RODRIGUES, Acácio G.. *Candida parapsilosis* Virulence and Antifungal Resistance Mechanisms: a comprehensive review of key determinants. **Journal Of Fungi**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 80, 5 jan. 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2309-608X/9/1/80>. Acesso em: 03 nov. 2024.
- BUCHER, Maite Ghazaleh *et al.* Reused poultry litter microbiome with competitive exclusion potential against *Salmonella* Heidelberg. **Journal Of Environmental Quality**, [S.L.], v. 49, n. 4, p. 869-881, 28 maio 2020. Disponível em: <https://access.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jeq2.20081>. Acesso em: 18 maio 2024.

CAULIER, Simon *et al.* Overview of the Antimicrobial Compounds Produced by Members of the *Bacillus subtilis* Group. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 10, p. 302, 26 fev. 2019. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2019.00302/full>. Acesso em: 16 nov. 2024.

CRIPPEN, Tawni L. *et al.* Poultry litter and the environment: microbial profile of litter during successive flock rotations and after spreading on pastureland. **Science Of The Total Environment**, [S.L.], v. 780, p. 146413, ago. 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0048969721014819>. Acesso em: 01 maio 24.

CZAJKA, Karolina M. *et al.* Molecular Mechanisms Associated with Antifungal Resistance in Pathogenic *Candida* Species. **Cells**, [S.L.], v. 12, n. 22, p. 2655-2687, 19 nov. 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4409/12/22/2655>. Acesso em: 07 set. 2024.

DADGOSTAR, Porooshat. Antimicrobial Resistance: implications and costs. **Infection And Drug Resistance**, [S.L.], v. 12, p. 3903-3910, dez. 2019. Disponível em: <https://www.dovepress.com/antimicrobial-resistance-implications-and-costs-peer-reviewed-fulltext-article-IDR>. Acesso em: 31 mar. 2024.

EL-HOUSSEINY, Ghadir *et al.* Optimization of antifungal activity by *Bacillus subtilis* isolate CCASU 2021-4 using Response Surface Methodology. **Archives Of Pharmaceutical Sciences Ain Shams University**, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 171-183, 1 jun. 2021. Disponível em: https://aps.journals.ekb.eg/article_179173.html. Acesso em: 17 ago. 2024.

EUCAST. **New definitions of S, I and R from 2019**. 2019. Disponível em: <https://www.eucast.org/newsiandr>. Acesso em: 10 maio 2024.

GHARIEB, Mohamed M.; RIZK, Aya; ELFEKY, Nora. Anticandidal activity of a wild *Bacillus subtilis* NAM against clinical isolates of pathogenic *Candida albicans*. **Annals Of Microbiology**, [S.L.], v. 74, n. 1, p. 1-19, 20 jul. 2024. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13213-024-01764-9>. Disponível em: <https://annalsmicrobiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13213-024-01764-9#citeas>. Acesso em: 20 nov. 2025.

GUTIERREZ, Alan; SCHNEIDER, Keith R.. Survival and inactivation kinetics of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in irradiated and natural poultry litter microcosms. **Plos One**, [S.L.], v. 17, n. 4, p. 267178-267192, 19 abr. 2022. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0267178>. Acesso em: 19 maio 2024.

HARWOOD, Colin R *et al.* Secondary metabolite production and the safety of industrially important members of the *Bacillus subtilis* group. **Fems Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 42, n. 6, p. 721-738, 19 jul. 2018. Disponível em:

<https://academic.oup.com/femsre/article/42/6/721/5056160>. Acesso em: 21 nov. 2024.

HELMY, Yosra A. *et al.* Antimicrobial Resistance and Recent Alternatives to Antibiotics for the Control of Bacterial Pathogens with an Emphasis on Foodborne Pathogens. *Antibiotics*, [S.L.], v. 12, n. 2, p. 274, 30 jan. 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-6382/12/2/274>. Acesso em: 12 maio 2024.

HUTCHINGS, Matthew I; TRUMAN, Andrew W; WILKINSON, Barrie. Antibiotics: past, present and future. **Current Opinion In Microbiology**, [S.L.], v. 51, p. 72-80, out. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527419300190>. Acesso em: 31 maio 2024.

JAMIU, Abdullahi Temitope; ALBERTYN, J; SEBOLAI, O M; POHL, C H. Update on *Candida krusei*, a potential multidrug-resistant pathogen. **Medical Mycology**, [S.L.], v. 59, n. 1, p. 14-30, 13 maio 2020. Disponível em: <https://academic.oup.com/mmy/article-abstract/59/1/14/5836561?redirectedFrom=fulltext&login=false>. Acesso em: 02 nov. 2024.

JIM O'NEILL (org.). **Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations**. Londres: Review On Antimicrobial Resistance, 2014. Disponível em: https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf. Acesso em: 08 abr. 2024.

JONES, Olga *et al.* Drug-Resistant Infections: a threat to our economic future. Washington D.C: World Bank Group, 2017. Disponível em: <https://documents.worldbank.org/en/publication/documents-reports/documentdetail/323311493396993758/final-report>. Acesso em: 13 maio 2024.

KOUNTCHOU, Cyrille Levis *et al.* Antifungal Resistance Profile, Biofilm Formation, and Virulence Factor Production in *Candida krusei* Isolates From HIV-Infected Patients in Cameroon. **Cureus**, [S.L.], v. 8, n. 15, p. 1-8, 27 ago. 2023. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10521937/>. Acesso em: 02 nov. 2024.

KONEMAN, Elmer W.. Bacilos Gram-Positivos Aeróbios Facultativos. In: KONEMAN, Elmer W. *et al.* **Diagnóstico Microbiológico**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018. Cap. 14. p. 1164-1294.

MADDURI, Madhuri; RUDRAMURTHY, Shivaprakash M.; ROY, Utpal. Two promising natural lipopeptides from *Bacillus subtilis* effectively induced membrane permeabilization in *Candida glabrata*. **Acta Biochimica Polonica**, [S.L.], v. 71, p. 11999, 31 jan. 2024. Disponível em: <https://www.frontierspartnerships.org/journals/acta-biochimica-polonica/articles/10.3389/abp.2024.11999/full>. Acesso em: 20 nov. 2024.

MINGMONGKOLCHAI, S.; PANBANGRED, W. *Bacillus* probiotics: an alternative to antibiotics for livestock production. **Journal Of Applied Microbiology**, [S.L.], v. 124,

n. 6, p. 1334-1346, 8 fev. 2018. Disponível em: <https://academic.oup.com/jambio/article-abstract/124/6/1334/6714458?redirectedFrom=fulltext>. Acesso em: 23 mar. 2024.

MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael A.. **Microbiologia Médica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

NWOBODO, David Chinemerem *et al.* Antibiotic resistance: the challenges and some emerging strategies for tackling a global menace. **Journal Of Clinical Laboratory Analysis**, [S.L.], v. 36, n. 9, p. 24655-24665, 10 ago. 2022. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcla.24655>. Acesso em: 14 maio 2024.

OMS. **Antimicrobial resistance**. 2023. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>. Acesso em: 16 maio 2024.

OMS. **The evolving threat of antimicrobial resistance: Options for action**. Genebra: Oms, 2012. Disponível em: <https://iris.who.int/handle/10665/44812>. Acesso em: 17 abr. 2024.

OMS. **WHO Bacterial Priority Pathogens list, 2024**. Genebra: Oms, 2024. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461>. Acesso em: 17 maio 2024.

OMS. **WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action**. Genebra: Oms, 2022. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/who-global-strategy-for-containment-of-antimicrobial-resistance>. Acesso em: 16 maio 2024.

OMS. **WHO Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance**. Genebra: Oms, 2001. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/who-global-strategy-for-containment-of-antimicrobial-resistance>. Acesso em: 06 abr. 2024.

OMS. **WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed**. 2017. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>. Acesso em: 16 maio 2024.

OMS. **WHO releases first-ever list of health-threatening fungi**. Genebra: Oms, 2022. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/25-10-2022-who-releases-first-ever-list-of-health-threatening-fungi>. Acesso em: 08 set. 2024.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Vaccines could avert half a million deaths associated with anti-microbial resistance a year**. 2023. Disponível em: [https://www.who.int/news/item/28-07-2023-vaccines-could-avert-half-a-million-deaths-associated-with-anti-microbial-resistance-a-year#:~:text=Globally%20there%20are%204.95%20million,with%20antimicrobial%20resistance%20\(AMR\)](https://www.who.int/news/item/28-07-2023-vaccines-could-avert-half-a-million-deaths-associated-with-anti-microbial-resistance-a-year#:~:text=Globally%20there%20are%204.95%20million,with%20antimicrobial%20resistance%20(AMR)). Acesso em: 01 abr. 2024.

PAPPAS, Peter G. *et al.* Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, [S.L.], v. 4, n. 1, p. 1-20, 11 maio 2018. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrdp201826>. Acesso em: 27 out. 2024.

P, Manikandan *et al.* Identification of Multi-Potent Protein Subtilisin A from halophilic bacterium *Bacillus firmus* VE2. **Microbial Pathogenesis**, [S.L.], v. 157, p. 105007, ago. 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0882401021002795?via%3Dihub>. Acesso em: 05 ago. 2024.

PERLIN, David s; RAUTEMAA-RICHARDSON, Riina; ALASTRUEY-IZQUIERDO, Ana. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. **The Lancet Infectious Diseases**, [S.L.], v. 17, n. 12, p. 383-392, dez. 2017. Disponível em: [https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(17\)30316-X/abstract](https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(17)30316-X/abstract). Acesso em: 18 abr. 2024.

PINO-HURTADO, Mario Sergio *et al.* Searching for Antimicrobial-Producing Bacteria from Soils through an Educational Project and Their Evaluation as Potential Biocontrol Agents. **Antibiotics**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 29, 28 dez. 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-6382/13/1/29>. Acesso em: 13 maio 2024.

PRASHANTHI, R. *et al.* Isolation, characterization, and molecular identification of soil bacteria showing antibacterial activity against human pathogenic bacteria. **Journal Of Genetic Engineering And Biotechnology**, [S.L.], v. 19, n. 1, p. 120, dez. 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1687157X23006625?via%3Dihub>. Acesso em: 04 maio 2024.

PRESTINACI, Francesca; PEZZOTTI, Patrizio; PANTOSTI, Annalisa. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. **Pathogens And Global Health**, [S.L.], v. 109, n. 7, p. 309-318, 7 set. 2015. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1179/2047773215Y.0000000030>. Acesso em: 06 abr. 2024.

PRISTOV, K.e.; GHANNOUM, M.A.. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. **Clinical Microbiology And Infection**, [S.L.], v. 25, n. 7, p. 792-798, jul. 2019. Disponível em: [https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(19\)30149-1/fulltext](https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(19)30149-1/fulltext). Acesso em: 26 out. 2024.

PROCÓPIO, Rudi Emerson de Lima *et al.* Antibiotics produced by *Streptomyces*. **The Brazilian Journal Of Infectious Diseases**, [S.L.], v. 16, n. 5, p. 466-471, set. 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1413867012001341?via%3Dihub>. Acesso em: 07 abr. 2024.

RANG, H. P. *et al.* **Rang & Dale: farmacologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

SILVA, Sónia *et al.* Candida glabrata, Candida parapsilosis and Candida tropicalis: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **Fems Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 36, n. 2, p. 288-305, mar. 2012. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsre/article/36/2/288/563981>. Acesso em: 21 nov. 2024.

SONG, Bo *et al.* Antifungal activity of the lipopeptides produced by Bacillus amyloliquefaciens anti-CA against Candida albicans isolated from clinic. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [S.L.], v. 97, n. 16, p. 7141-7150, 7 jun. 2013. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-013-5000-0>. Acesso em: 26 abr. 2024.

SPAGGIARI, Luca *et al.* Bacillus coagulans LMG S-24828 Impairs Candida Virulence and Protects Vaginal Epithelial Cells against Candida Infection In Vitro. **Microorganisms**, [S.L.], v. 12, n. 8, p. 1634, 10 ago. 2024. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2076-2607/12/8/1634>. Acesso em: 20 nov. 2024.

SUMI, Chandra Datta *et al.* Antimicrobial peptides of the genus Bacillus: a new era for antibiotics. **Canadian Journal Of Microbiology**, [S.L.], v. 61, n. 2, p. 93-103, fev. 2015. Disponível em: <https://cdnsiencepub.com/doi/10.1139/cjm-2014-0613>. Acesso em: 18 mar. 2024.

TORTORA, Gerard J.. Fármacos Antimicrobianos. In: TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L.. **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. p. 549-578

VIDOVIC, Nikola; VDOVIC, Sinisa. Antimicrobial Resistance and Food Animals: influence of livestock environment on the emergence and dissemination of antimicrobial resistance. **Antibiotics**, [S.L.], v. 9, n. 2, p. 52, 31 jan. 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-6382/9/2/52>. Acesso em: 31 mar. 2024.

WAKISAKA, Yoshiharu; KOIZUMI, Kenzo. An enrichment isolation procedure for minor Bacillus populations. **The Journal Of Antibiotics**, [S.L.], v. 35, n. 4, p. 450-457, 1982. Disponível em: https://www.jstage.jst.go.jp/article/antibiotics1968/35/4/35_4_450/_article. Acesso em: 28 nov. 2024.

WANG, Weichen; ZHAO, Jin; ZHANG, Zhizi. Bacillus Metabolites: compounds, identification and anti-candida albicans mechanisms. **Microbiology Research**, [S.L.], v. 13, n. 4, p. 972-984, 5 dez. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/microbiolres13040070>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2036-7481/13/4/70>. Acesso em: 20 nov. 2024.

WOODS, Michael; MCALISTER, Jason A.; GEDDES-MCALISTER, Jennifer. A One Health approach to overcoming fungal disease and antifungal resistance. **Wires Mechanisms Of Disease**, [S.L.], v. 15, n. 4, p. 1-21, 26 abr. 2023. Disponível em: <https://wires.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/wsbm.1610>. Acesso em: 21 abr. 2024.

ZHAO, C. *et al.* In vitro inhibitory activity of probiotic products against oral Candida species. **Journal Of Applied Microbiology**, [S.L.], v. 121, n. 1, p. 254-262, 9 maio

2016. Disponível em:

<https://academic.oup.com/jambio/article-abstract/121/1/254/6717347?redirectedFrom=fulltext>. Acesso em: 20 nov. 2024.

<i>Bacillus subtilis</i>	6	12	18	14	0	0	10	13	0	0
<i>Bacillus licheniformis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	13	15	16	14	0	0	15	17	0	0
<i>Bacillus licheniformis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	13	15	17	15	0	0	16	16	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	13	12	17	20	0	0	18	17	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	0	0	9	6	0	0	7	8	0	0
<i>Bacillus licheniformis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	6	0	10	6	0	0	8	10	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	9	13	15	12	0	0	16	14	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	4	4	8	10	0	0	8	10	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	8	8	16	7	0	0	11	15	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	13	10	16	16	0	0	16	15	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	12	12	16	15	0	0	14	15	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	7	5	12	13	0	0	12	14	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	10	12	17	18	0	0	10	17	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	4	1	12	9	0	0	10	9	0	0
<i>Bacillus licheniformis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	7	8	11	15	0	0	12	12	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	8	7	17	16	0	0	14	18	0	0

<i>Bacillus subtilis</i>	6	11	17	15	0	0	11	16	0	0
--------------------------	---	----	----	----	---	---	----	----	---	---

**APÊNDICE B – RESULTADOS DE INIBIÇÃO EM DUPLICATA DA TRIAGEM
SECUNDÁRIA, EM MILÍMETROS**

Espécie	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	20	21	29	26	20	18
<i>Bacillus subtilis</i>	19	20	29	25	19	20
<i>Bacillus licheniformis</i>	19	19	28	27	19	21
<i>Bacillus subtilis</i>	21	20	29	26	22	21
<i>Bacillus subtilis</i>	24	19	29	28	24	23
<i>Bacillus subtilis</i>	24	22	28	27	26	22
<i>Bacillus subtilis</i>	23	19	25	24	23	19
<i>Bacillus subtilis</i>	24	20	27	27	23	22
<i>Bacillus subtilis</i>	20	17	27	25	20	20
<i>Bacillus subtilis</i>	18	18	22	22	18	18
<i>Bacillus subtilis</i>	23	20	24	20	20	19
<i>Bacillus subtilis</i>	21	21	27	25	20	20
<i>Bacillus subtilis</i>	21	22	25	25	21	19
<i>Bacillus subtilis</i>	19	18	27	25	17	20
<i>Bacillus subtilis</i>	18	18	19	19	15	15
<i>Bacillus subtilis</i>	20	20	25	22	22	22
<i>Bacillus</i>	21	22	26	24	20	23

<i>subtilis</i>						
<i>Bacillus subtilis</i>	23	20	25	22	20	20
<i>Bacillus subtilis</i>	22	20	27	27	21	22
<i>Bacillus subtilis</i>	23	21	28	23	20	22
<i>Bacillus subtilis</i>	21	16	22	20	11	15
<i>Bacillus subtilis</i>	22	21	26	24	21	18
<i>Bacillus subtilis</i>	21	20	29	26	23	21
<i>Bacillus subtilis</i>	25	24	27	26	22	20