



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
FACULDADE DE MEDICINA – FAMED
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



**SOBRENADANTE DE *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4653: ANÁLISE FÍSICO-
QUÍMICA E AÇÃO LARVICIDA SOBRE *Toxocara canis***

CAROLINA NETTO DE OLIVEIRA DA CUNHA

RIO GRANDE

2023



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
FACULDADE DE MEDICINA – FAMED
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



SOBRENADANTE DE *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356: ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA E AÇÃO LARVICIDA SOBRE *Toxocara canis*

Carolina Netto de Oliveira da Cunha

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande, como requisito para a obtenção do título de Mestre

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Luciana F. da Costa de Avila

RIO GRANDE, 2023

SOBRENADANTE DE *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356: ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA E AÇÃO LARVICIDA SOBRE *Toxocara canis*

Carolina Netto de Oliveira da Cunha

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande, como requisito para a obtenção do título de Mestre

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Luciana Farias da Costa de Avila (FURG - Orientadora)

Prof. Dr. Carlos James Scaini (FURG)

Prof. Dr. Rodolfo Carapelli (Escola de Química e Alimentos – FURG)

Prof^a. Dr^a. Talita Bandeira Roos (Universidade Federal do Pará- Membro Externo)

Prof^a. Dr^a. Vanusa Pousada da Hora (FURG - suplente)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Adriane e Valdeci, por todo o amor e sempre me incentivaram a seguir os meus sonhos. Amo muito vocês!!! Também gostaria de fazer uma homenagem aos meus familiares que sempre me apoiaram ao longo da vida, amo vocês e muito obrigada!

A minha amiga Dyéssika que sempre esteve ao meu lado nas horas boas e ruins ao longo de mais de quinze anos de amizade. Também gostaria de agradecer as amigadas que fiz ao longo do mestrado como a Gabi, Débora Walcher, Débora Carvalho, Micaele, Larissa, Nicholas, Victória agradeço a todas pelo companheirismo, ensinamentos e sempre trabalhamos com muita alegria e entusiasmo.

Ao Centro Integrado de Análises da Universidade Federal do Rio Grande, principalmente ao técnico Jean pela disponibilidade para realização das análises do sobrenadante e pela paciência ao ensinar todo o processo.

A Escola de Química e Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande, principalmente ao Prof. Rodolfo Carapelli e ao João Espinelli que prontamente realizaram as análises do sobrenadante contribuindo muito para a realização dessa dissertação e obrigada por toda paciência e ensinamentos.

Ao grupo do Núcleo de Parasitologia Experimental pelos ensinamentos, a amizade ao longo do mestrado, vocês se tornaram minha segunda família. Gostaria de agradecer ao Prof. Scaini e a Prof^a. Luciana com quem tive a oportunidade de começar a acompanhar projetos que estavam em andamento que foram muito importantes para a elaboração dessa dissertação pois me proporcionaram um grande aprendizado. Aos técnicos Lurdinha, Gabriel, Márcia, Ana e a médica veterinária Lívia que ao longo desses dois anos se tornaram grandes amigos e companheiros para todas as horas.

A minha orientadora, Prof^a. Luciana Farias da Costa de Avila, gostaria de agradecer pelos ensinamentos ao longo do mestrado, por toda a paciência, pela compreensão nos momentos difíceis e por sempre ter uma palavra de carinho o que me ajudou muito ao longo dessa trajetória. Gratidão!

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – FURG pela bolsa que permitiu dois anos de formação acadêmica de qualidade.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Quantificação de ácido láctico (g/L) por HPLC, em amostras de sobrenadante de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, cultivadas de diferentes maneiras.....23

Figura 2. Concentração de ácido láctico e ácido acético, por HPLC, no sobrenadante de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 puro e diluído em PBS.....24

Figura 3. Viabilidade de larvas de *Toxocara canis* (%) cultivadas com o sobrenadante de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 puro e diluído (1:2 até 1:128)26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAL – bactéria ácido láctica

FIOCRUZ- Fundação Oswaldo Cruz

g/L- Gramas por litro

HPLC- Cromatografia líquida de alta eficiência

H₂SO₄ – Ácido sulfúrico

IL - Interleucina

Ig- Imunoglobulina

KI – Iodeto de potássio

KIO₃- Iodato de potássio

MRS- Man Rogosa and Sharpe

mg/L – Miligramas por litro

mg- Miligramas

mmol/L – Milimol por litro

(NH₄)₆Mo₇O₂₄ – Molibdato de amônio

PBS- Phosphate buffered saline

RESUMO

CUNHA, C.N.O. SOBRENADANTE DE *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356: ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA E AÇÃO LARVICIDA SOBRE *Toxocara canis* 2023. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS.

Introdução: A toxocaríase é uma antroponose parasitária negligenciada. Na busca por métodos de controle, estudos que avaliam o efeito de probióticos têm mostrado resultados promissores. A partir de estudo anterior realizado por nosso grupo de pesquisa, foi possível observar que o sobrenadante do probiótico *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 promoveu morte de 100% das larvas de *Toxocara canis* no teste *in vitro*. Assim, o presente estudo visou investigar características do sobrenadante de *L. acidophilus* ATCC 4356 que possam estar envolvidas no efeito larvicida sobre *Toxocara canis*. **Materiais e Métodos:** Considerando que o ácido láctico está entre os principais metabólitos de *L. acidophilus*, inicialmente foi avaliado se a forma de cultivo interfere na concentração deste ácido orgânico no sobrenadante. Para tal, foram realizados diferentes cultivos de *L. acidophilus* ATCC 4356, com diferenças quanto ao meio de cultura, à temperatura e ao tempo de cultivo. O sobrenadante obtido foi filtrado e quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Foi também avaliada a concentração de ácido acético, por HPLC, o pH e os níveis de peróxido de hidrogênio, por volumetria de oxidorredução, no sobrenadante puro e em diluições seriadas (1:2 até 1:128). Para a avaliação do efeito larvicida, larvas de *T. canis* foram cultivadas em meio RPMI 1640 juntamente com o sobrenadante puro ou diluído em placa de 96 poços, em triplicata. Como controle de larvas mortas foram utilizadas larvas congeladas a -20°C e submetidas a choque térmico à 60°C e, como controle de larvas vivas, foram usadas larvas cultivadas em meio MRS ou RPMI 1640. A placa foi incubada em estufa a 37°C com 5-10% de CO₂ por 48 horas e, após, foi adicionado o marcador de viabilidade celular azul de tripan, tendo sido realizada a leitura em microscópio óptico. **Resultados:** A forma de cultivo não alterou significativamente a concentração de ácido láctico no sobrenadante, sendo observada uma concentração máxima de 19,1 g/L. Em relação ao ácido acético, foi observada uma concentração de 5,0 g/L no sobrenadante puro. Foi observado um pH ácido de 3,8 quando o sobrenadante foi avaliado puro, mantendo-se ácido nas diluições de 1:2 até 1:16. Quando avaliado nas diluições 1:32 até 1:128 o pH estava neutro. Em relação a análise dos níveis de peróxido de hidrogênio, o valor encontrado foi inferior a 14,0 mg/L na amostra do sobrenadante puro. No teste *in vitro*, mesmo após ser diluído 1:2, foi observada uma ação 100% larvicida do sobrenadante sobre *Toxocara canis*. **Conclusões:** A partir dos resultados obtidos, pode-se sugerir que a presença de concentrações mais elevadas de ácido láctico e a acidez do sobrenadante puro e diluído 1:2 estão relacionados à ação larvicida sobre *Toxocara canis*. O sobrenadante *L. acidophilus* ATCC 4356 diluído 1:2 parece ser a melhor opção, uma vez que mantém as características de acidez e a ação larvicida.

Palavras chaves: Toxocaríase; Ácido láctico; Ácido acético; Peróxido de hidrogênio; Efeito larvicida

ABSTRACT

CUNHA, C.N.O. SUPERNATANT OF *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356: PHYSICOCHEMICAL ANALYSIS AND LARVICIDAL ACTION ON *Toxocara canis*. 2023. Dissertation (Master's Degree) – Graduate Program in Health Sciences. Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande, Rio Grande, RS.

Introduction: Toxocariasis is a neglected parasitic anthroponosis. In the search for control methods, studies that evaluated the effect of probiotics showed promising results. From the previous study carried out in our research group, it was possible to observe that the supernatant of the probiotic *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 promoted the death of 100% of the larvae of *Toxocara canis* not tested in vitro. Thus, the present study aims to investigate characteristics of the supernatant of *L. acidophilus* ATCC 4356 that may be involved in the larvicidal effect on *Toxocara canis*. **Materials and Methods:** Considering that lactic acid is among the main metabolites of *L. acidophilus*, it was initially evaluated whether the culture method interferes with the concentration of this organic acid in the supernatant. For this purpose, different cultivations of *L. acidophilus* ATCC 4356 were carried out, with differences in culture medium, temperature and cultivation time. The supernatant obtained was filtered and quantified by high performance liquid chromatography (HPLC). The concentration of acetic acid, by HPLC, the pH and the levels of hydrogen peroxide, by redox volumetry, in the pure supernatant and in serial dilutions (1:2 to 1:128) were also evaluated. To evaluate the larvicidal effect, *T. canis* larvae were cultured in RPMI 1640 medium together with the pure or diluted supernatant in 96-well plates, in triplicate. As a control of dead larvae, larvae frozen at -20°C and kept in thermal shock at 60°C were used, and as a control of live larvae, larvae cultivated in MRS or RPMI 1640 medium were used. The plate was incubated in an oven at 37°C with 5-10% of CO₂ for 48 hours and then trypan blue cell viability marker was added and read under an optical microscope. **Results:** The culture method did not significantly alter the lactic acid concentration in the supernatant, with a maximum concentration of 19.1 g/L being observed. Regarding acetic acid, a concentration of 5.0 g/L was observed in the pure supernatant. An acidic pH of 3.8 was observed when the supernatant was evaluated neat, remaining acidic at dilutions from 1:2 to 1:16. When we evaluated the dilutions from 1:32 to 1:128, the pH was neutral. Regarding the analysis of hydrogen peroxide levels, the value found was less than 14.0 mg/L in the pure supernatant sample. No in vitro test, even after being diluted 1:2, a 100% larvicidal action of the supernatant on *Toxocara canis* was observed. **Conclusions:** From the results obtained, it can be suggested that the presence of higher concentrations of lactic acid and the acidity of the pure and diluted 1:2 supernatant are related to the larvicidal action on *Toxocara canis*. The *L. acidophilus* ATCC 4356 supernatant diluted 1:2 seems to be the best option, since it maintains acidity characteristics and larvicidal action.

Keywords: Toxocariasis; Lactic acid; Acetic Acid; Hydrogen peroxide; Larvicidal effect

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
1.1. <i>Toxocara canis</i> e Toxocaríase humana	10
1.2. Uso de probióticos e sobrenadantes	12
1.3. Ação dos metabólitos presentes no sobrenadante do cultivo de probióticos.....	12
1.4. Influência do pH do sobrenadante sobre patógenos	13
1.5. Estudos <i>in vitro</i> da ação de sobrenadantes sobre agentes infecto-parasitários.....	14
2. OBJETIVOS	15
2.1. Objetivos Gerais	15
2.2. Objetivos Específicos.....	15
3. MANUSCRITO	16
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	33
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. *Toxocara canis* e Toxocaríase humana

Entre os nematódeos pertencentes a superfamília Ascaridoidea (GASSER, 2013), estão os helmintos do gênero *Toxocara* spp. A espécie *T. canis* habita o intestino delgado de canídeos domésticos e selvagens e é a mais associada à infecção humana (HOLLAND et al., 2015). A toxocaríase é uma importante parasitose tecidual negligenciada (CDC, 2022), de distribuição cosmopolita, detectada principalmente em regiões de clima tropical e subtropical e em condições socioeconômicas desfavoráveis (SCHURER et al. 2016; ROSTAMI et al., 2019). Estudos de contaminação do solo demonstram a alta prevalência de ovos de *Toxocara* spp. em parques públicos, o que estaria relacionado à presença de cães e gatos, os quais possuem acesso livre a esses locais (PAPAVASILOPOULOS et al., 2018; TYUNGU et al., 2020). Nesse contexto, é importante salientar sobre o conceito de Saúde Única ou *One Health*, trazendo principalmente o aprimoramento de profissionais como o médico veterinário junto aos outros profissionais de saúde na tentativa de elucidar sobre controle e a prevenção dessa importante parasitose (FIALHO et al., 2020; SCHWARTZ et al., 2021).

Os seres humanos são hospedeiros acidentais e a principal forma de infecção é pela ingestão de ovos presentes no meio ambiente (MAZUR-MELEWSKA et al., 2016; HOLLAND et al., 2015; CHEN et al., 2018), podendo também ocorrer através da ingestão de larvas presentes em carnes e vísceras cruas ou mal-cozidas de hospedeiros paratênicos como ruminantes, suínos e aves (MERIGUETI et al., 2018). Após a ingestão da forma infectante, as larvas invadem a mucosa intestinal e migram para órgãos como o fígado, pulmões, musculatura esquelética estriada, coração, olhos e encéfalo (MA et al., 2018).

As apresentações clínicas da toxocaríase humana são: a síndrome da larva *migrans* visceral que acomete, principalmente, crianças com idade entre dois e cinco anos, geralmente com histórico de geofagia (HOLLAND et al, 2015; CHEN et al., 2018). Os sinais clínicos e sintomas mais comumente associados são: febre, tosse, dor abdominal e hepatomegalia com leucocitose, eosinofilia, hipergamaglobulinemia e aumento sérico de IgE (WILKINS.,2014). Outras apresentações clínicas são a neurotoxocaríase na qual pode ocorrer meningite eosinofílica aguda. A toxocaríase ocular, geralmente unilateral, na qual granulomas na retina e endoftalmia podem ser identificados a partir do exame

34 oftalmológico. Além disso, também há a toxocaríase oculta na qual pacientes
35 permanecem com sinais clínicos inespecíficos podendo ser acompanhado de eosinofilia
36 (WILKINS.,2014; HOLLAND et al., 2015; KOHLER et al.,2017).

37 O diagnóstico da toxocaríase humana é complexo e baseia-se em dados clínicos e
38 epidemiológicos (principalmente o contato com cães jovens, hábitos de geofagia), no
39 diagnóstico sorológico, e em exames de imagem para a detecção de granulomas nos
40 tecidos (MA et al., 2018; ROSTAMI et al., 2019). O diagnóstico sorológico é realizado
41 pela pesquisa de anticorpos IgG através do ensaio imunoenzimático (ELISA) e Western
42 blot que utilizam o antígeno de excreção e secreção (TES) das larvas de *Toxocara canis*
43 (ROLDÁN et al., 2015; ROLDÁN et al., 2017). Com o intuito de melhorar a
44 especificidade, atualmente testes sorológicos utilizando proteínas recombinantes TES-30
45 e TES-120 têm sido propostos (SANTOS et al., 2018). Uma alternativa diagnóstica
46 seriam os testes moleculares como a reação de cadeia em polimerase (PCR) por
47 apresentarem alta especificidade, sendo utilizada para a detecção de larvas em biópsias
48 oculares (CHEN et al., 2018). Um estudo para investigar os genes Tc-mir-21 e Tc-mir-
49 103a a partir de amostras de soros de pacientes com anticorpos para toxocaríase
50 apresentou resultados promissores como biomarcador e futura ferramenta diagnóstica
51 para a toxocaríase (RAISSI et al., 2022).

52 Em relação ao tratamento da toxocaríase humana, este baseia-se principalmente
53 na administração de anti-helmínticos como albendazol, mebendazol e tiabendazol
54 (MACPHERSHON et al., 2013), sendo o albendazol o medicamento de primeira escolha
55 para o tratamento da toxocaríase devido a sua maior absorção nos tecidos extra intestinais
56 (HOMBU et al., 2017). É importante salientar que estes medicamentos são os mesmos
57 desenvolvidos e utilizados para o tratamento de parasitoses intestinais, com a ascaridíase,
58 por exemplo. Dessa forma eles apresentam prioritariamente ação local e são
59 pouquíssimos absorvidos, o que dificulta a chegada do princípio ativo em sítios distantes,
60 onde estão localizadas as larvas de *T. canis*. Além disso, algumas vezes é realizado um
61 tratamento de suporte principalmente com o uso de anti-inflamatórios esteroidais e não
62 esteroidais (FIALHO et al., 2020). Tendo em vista as dificuldades terapêuticas atuais,
63 pesquisas e investimentos são necessários na área da prevenção, controle e tratamento
64 para esta zoonose parasitária.

65

66 1.2. Uso de probióticos e sobrenadantes

67 Probióticos são caracterizados como microrganismos vivos que, quando
68 administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro
69 (FAO/WHO, 2001). Dentro da parasitologia diversos são os estudos realizados que
70 demonstram os efeitos de probióticos, seja para a prevenção ou para o tratamento, usados
71 de forma isolada ou associada. Na tentativa de tornar o hospedeiro mais resistente à
72 infecção por *T. canis* e conseguir evitar a infecção ou minimizar o número de larvas
73 invasoras, alguns probióticos já foram testados e apresentaram efeitos promissores em
74 murinos: *Enterococcus faecalis* CECT7121 (CHIODO et al., 2010), *Saccharomyces*
75 *boulardii* (AVILA et al., 2012; AVILA et al., 2013), *Lactobacillus rhamnosus* ATCC
76 7469 (WALCHER et al., 2017) e *L. acidophilus* ATCC 4356 (CADORE et al., 2019).
77 Dentre estes, a cepa ATCC 4356 de *L. acidophilus* merece destaque pois, quando testado
78 o sobrenadante, este promoveu a inativação de 100% das larvas de *T. canis in vitro*
79 (WALCHER, 2019).

80 Embora a maioria dos resultados benéficos de probióticos conhecidos até o
81 momento seja referente ao uso das células dos microrganismos em si, estudos realizados
82 com sobrenadantes evidenciam a ação protetora destes. Um exemplo é *Lactobacillus*
83 *rhamnosus* Slab51 no qual o sobrenadante obtido a partir da cultura promoveu efeito
84 cardioprotetor melhorando a função miocárdica em modelos experimentais murinos
85 expostos a hipóxia intermitente (XU et al., 2019). Em outro estudo, o uso do sobrenadante
86 de *L. rhamnosus* GG foi associado a um aumento da integridade da barreira intestinal
87 uma vez que houve redução de translocação bacteriana (CHEN et al., 2016). Da mesma
88 maneira o sobrenadante de *L. gasseri*, inibiu a translocação de *Pseudomonas aeruginosa*,
89 evitando a disseminação da infecção em modelos experimentais murinos (LENZMEIER
90 et al., 2019).

91

92 1.3. Ação dos metabólitos presentes no sobrenadante do cultivo de probióticos

93 Entre as funções dos compostos presentes no sobrenadante de probióticos do
94 gênero *Lactobacillus* estão: aumento da secreção de muco pelas células caliciformes,
95 estímulo da resposta imune inata, aumento da secreção de peptídeos antimicrobianos,
96 aumento da expressão de genes relacionados às junções estreitas reforçando a barreira

97 epitelial intestinal, além da produção de proteínas, enzimas proteolíticas e ácidos graxos
98 de cadeia curta (LIM et al., 2018; NOOROZI et al., 2019; LIU et al.,2020).

99 Quanto aos metabólitos produzidos pelos probióticos do gênero *Lactobacillus*, os
100 principais são: ácido lático, ácido acético, ácido propiônico, ácido butírico, ácido málico,
101 ácido succínico, ácido cítrico, peróxido de hidrogênio, bacteriocinas e surfactantes
102 (RISHI et al.2017; SGIBNEV & KREMLEVA, 2017; ADETOYE et al., 2018;
103 LIPINSKA et al., 2018; KRALIK et al., 2018; CHEN et al.,2020). Dentre estes, o ácido
104 lático, o ácido acético e o peróxido de hidrogênio são os principais metabólitos (PLAZA-
105 DIAZ et al., 2019; SALARI et al., 2020). Em relação aos ácidos lático e acético, esses
106 promovem a desestabilização da membrana, lise celular, degradação de ácidos nucleicos,
107 inibição da síntese de proteínas, redução do pH e a liberação de íons de hidrogênio que
108 comprometem a integridade da parede celular bacteriana. Estes fatores estão relacionados
109 à inviabilização ou mesmo a morte de patógenos (GONG et al., 2016; NARDINI et al.;
110 2016; DIAS et al., 2018).

111 Outras ações do ácido lático seriam a manutenção da homeostase intestinal e
112 imunológica do organismo, com a mobilização de macrófagos com atividade anti-
113 inflamatória e renovação de enterócitos (MARKOWIAK-KOPEĆ et al., 2020). Em
114 relação ao peróxido de hidrogênio, alguns mecanismos de ação desse metabólito são:
115 bloquear a síntese e a atividade das enzimas antioxidantes de bactérias e diminuir a adesão
116 celular bacteriana (SGIBNEV & KREMLEVA, 2017; MANN et al., 2021).

117

118 **1.4. Influência do pH do sobrenadante sobre patógenos**

119

120 O pH tem sido um fator pesquisado nos estudos com sobrenadantes obtidos a
121 partir do cultivo de probióticos. Uma pesquisa conduzida por Rana *et al.* (2020) comparou
122 a inibição da formação de biofilme e a inibição de "*quorum sensing*" de *Pseudomonas*
123 *aeruginosa* após a utilização de sobrenadantes com pH ácido e com pH neutro, tendo sido
124 observada uma importante ação anti-biofilme e de inibição de *quorum sensing* em pH
125 ácido (~ pH 4,0). Resultado semelhante foi observado com sobrenadantes de *L. crispatus*
126 e *L. plantarum* os quais mostraram uma ação fungistática contra *Candida* spp. em pH
127 ácido (PAROLIN et al., 2021) e não tiveram ação contra *Candida albicans* em pH neutro
128 (JANG et al., 2019).

129

1.5. Estudos *in vitro* da ação de sobrenadantes sobre agentes infecto-parasitários

Estudos *in vitro* vêm demonstrando a ação de sobrenadantes de probióticos, contra microrganismos patogênicos como leveduras (SALARI et al., 2020) e bactérias, sendo observada propriedades anti-adesivas e de inibição da formação de biofilme (JEYANATHAN et al., 2021). Sobrenadantes obtidos a partir do cultivo de *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp., inibiram o crescimento micelial e germinação de esporos de *Penicillium expansum*, sendo esse agente importante causador de danos a agricultura (QIAU et al., 2020). Outro estudo, demonstrou a atividade do sobrenadante de *Lactobacillus plantarum* NIBR97 sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* reduzindo o crescimento dessas bactérias em quase 100% (KIM et al., 2020).

Em parasitologia, estudos demonstraram a ação de metabólitos do sobrenadante de *Lactobacillus reuteri* ATCC 23272 e *Lactobacillus acidophilus* ATCC 700396, os quais inviabilizaram oocistos de *Cryptosporidium parvum* em mais de 80% (FOSTER et al., 2003). Resultado semelhante foi observado com o sobrenadante de *Lactobacillus rhamnosus* NZRM 299 o qual promoveu a inibição da esporulação de oocistos de *Eimeria* sp., bem como a inibição da multiplicação e adesão de trofozoítos de *Giardia duodenalis* (MOLAN, 2014; PERRUCCI et al., 2019). Em relação à toxocaríase, foi observada ação larvicida sobre 94% das larvas de *Toxocara canis* quando cultivadas juntamente com o sobrenadante de *Enterococcus faecalis* CECT7121, e uma redução de 70% na intensidade de infecção de murinos suplementados com esse sobrenadante (CHIODO et al., 2010). Seguindo a mesma linha, quando testada ação *in vitro* do sobrenadante de *L. acidophilus* ATCC 4356 foi observado um resultado extraordinário, com 100% de morte das larvas de *T. canis* (WALCHER, 2019). Assim, é importante dar continuidade nessa pesquisa e avaliar características do sobrenadante e prováveis metabólitos presentes no sobrenadante que possam estar envolvidos na ação sobre as larvas de *Toxocara canis*.

164 **2. OBJETIVOS**

165

166 **2.1. Objetivos Gerais**

167

168 Investigar características do sobrenadante de *Lactobacillus acidophilus* ATCC
169 4356 que possam estar envolvidas no efeito larvicida sobre *Toxocara canis*

170

171 **2.2. Objetivos Específicos**

172

173 Avaliar características físico-químicas como a concentrações de ácido láctico, de
174 ácido acético e peróxido de hidrogênio e o pH no sobrenadante de *Lactobacillus*
175 *acidophilus* ATCC 4356;

176

177

178 Avaliar o efeito larvicida de diferentes concentrações de sobrenadante de
179 *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 sobre *Toxocara canis in vitro*;

180

181

182

183

184

185

186

187

188

189

190

191

192

193 **3. MANUSCRITO**

194

- 195 ➤ Manuscrito redigido de acordo com a Revista Memórias do Instituto Oswaldo
- 196 Cruz
- 197 ➤ Fator de Impacto: 2.743

198

199 **O potencial de ação larvicida de metabólitos presentes no sobrenadante de**200 ***Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 sobre *Toxocara canis***

201

202 Carolina Netto de Oliveira da Cunha^{1*}, Stéfani Rodeghiero Collares², Débora Carvalho
203 Rodrigues¹, Débora Liliane Walcher¹, Micaele Quintana de Moura¹, Lourdes Helena
204 Rodrigues Martins¹, Gabriel Baracy Klafke¹, Jean Lucas de Oliveira Arias³, Rodolfo
205 Carapelli⁴, João Batista do Santos Espinelli Junior⁴, Carlos James Scaini¹, Luciana Farias
206 da Costa de Avila¹

207

208 ¹ Faculdade de Medicina (FAMED)/Laboratório de Parasitologia, Universidade Federal de Rio Grande,
209 General Osório, S/N, CEP 96200-190, Rio Grande, RS, Brasil

210 ² Bolsista de iniciação científica. Laboratório de Parasitologia, FAMED-FURG

211 ³ Centro Integrado de Análises, Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Av.
212 Itália, Km 6 - Campus Carreiros, CEP 96203-900, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil

213 ⁴ Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Avenida Itália, km 08 – Campus
214 Carreiros, CEP 96.203-900 Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil

215

216 **RESUMO:** A toxocaríase humana é uma antropozoonose parasitária que apresenta
217 dificuldades em relação ao tratamento e controle. Estudo prévio realizado com
218 *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 revelou que o sobrenadante desse probiótico foi
219 capaz de inviabilizar 100% das larvas de *Toxocara canis*. O objetivo do presente estudo
220 foi investigar características do sobrenadante de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356
221 que possam estar envolvidas no efeito larvicida sobre *T. canis*. Foi possível identificar
222 elevada concentração de ácido láctico e ácido acético no sobrenadante puro, chegando a
223 19,1 e 5,0 g/L, respectivamente. Foi observada acidez do sobrenadante puro com um pH
224 = 3,8, mantendo-se ácido nas diluições 1:2 até 1:16, com pH variando de 3,8 a 4,6. Com
225 relação ao efeito larvicida *in vitro*, foi possível observar 100% de morte das larvas de *T.*
226 *canis* utilizando o sobrenadante puro assim como na diluição 1:2. A partir desses
227 resultados podemos inferir que a presença de ácidos orgânicos em concentrações mais

228 elevadas e o baixo pH do meio contribuem para a ação larvicida do sobrenadante de *L.*
229 *acidophilus* ATCC 4356. Além disso, a manutenção do efeito larvicida, mesmo após ser
230 diluído, sugere uma maior chance deste sobrenadante promover também uma ação contra
231 *T. canis in vivo*.

232

233 **Palavras-chave:** Sobrenadante; Ácido láctico; Ácido acético; Peróxido de hidrogênio;
234 Toxocaríase.

235

236 3.1. INTRODUÇÃO

237

238 A toxocaríase humana é uma parasitose tecidual causada principalmente pelo
239 nematódeo *Toxocara canis*, parasito intestinal de canídeos selvagens e domésticos^[1]. Os
240 seres humanos são considerados hospedeiros acidentais e se infectam principalmente ao
241 ingerirem ovos embrionados presentes em alimentos e no meio ambiente^[2-3]. Outro modo
242 de contaminação é através da ingestão de larvas presentes em carnes e vísceras cruas ou
243 malcozidas de mamíferos e aves considerados hospedeiros paratênicos^[4]. O tratamento
244 da toxocaríase é baseado principalmente na administração de anti-helmínticos da classe
245 dos benzimidazóis, sendo o albendazol o fármaco de primeira escolha, entretanto
246 apresentam eficácia baixa a moderada^[5-6].

247 Nesse contexto, o uso de probióticos tem sido testado e alguns demonstraram ação
248 direta sobre as larvas e redução da intensidade de infecção em modelos experimentais
249 murinos^[7-8]. Além da utilização do microrganismo probiótico, estudos têm demonstrado
250 a ação benéfica do sobrenadante de cultivo^[9]. Um estudo que merece destaque foi
251 realizado com o sobrenadante de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, o qual
252 demonstrou 100% de ação larvicida *in vitro* sobre *Toxocara canis*^[9].

253 Dentre as bactérias do gênero *Lactobacillus*, os principais metabólitos presentes
254 no sobrenadante de cultivo são os ácidos orgânicos, com destaque para o ácido láctico e
255 ácido acético, as proteínas e o peróxido de hidrogênio^[10-11]. O ácido láctico e acético estão
256 envolvidos principalmente na redução do pH, na resposta imune do hospedeiro, com a
257 regulação da IL8, e na inibição de estruturas de resistência de patógenos^[12-13]. Além
258 disso, o peróxido de hidrogênio está relacionado à atividade antimicrobiana através da
259 diminuição da adesão de bactérias patogênicas à cavidade oral^[14] e também a morte de
260 *Nanophyetus salmincola*, trematoda que pode causar doença em humanos.^[15] O presente

261 estudo teve como objetivo quantificar a concentração de ácido láctico e acético, de
262 peróxido de hidrogênio e o pH do sobrenadante de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356
263 puro e diluído e avaliar se as diluições do sobrenadante mantém sua característica
264 larvívora sobre *Toxocara canis*.

265

266 **3.2. MATERIAIS E MÉTODOS**

267 **3.2.1. Obtenção dos ovos e larvas de *Toxocara canis***

268 A partir do tratamento com pamoato de pirantel (12.5 mg/kg), cães jovens
269 naturalmente infectados eliminaram formas adultas de *Toxocara canis*. Foi realizada a
270 histerectomia nas fêmeas de *T. canis* e os ovos foram incubados em solução formalina a
271 2%, temperatura de 28°C e umidade superior a 80% e oxigenação por 30 dias ^[15]. Após,
272 foi realizada a extração de larvas de acordo com DE SAVIGNY ^[16] com modificações,
273 sendo estas cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com penicilina, estreptomicina
274 e fungizona em estufa à 37°C com 5-10% de CO₂.

275

276 **3.2.2. Cultivo do probiótico *Lactobacillus acidophilus* para a obtenção do** 277 **sobrenadante**

278 *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 foi obtido liofilizado da Fundação
279 Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro (FIOCRUZ-RJ). Inicialmente foram realizados quatro
280 diferentes protocolos de cultivos de *L. acidophilus* ATCC4356, a fim de selecionar aquele
281 com a maior concentração de ácido láctico no sobrenadante, parâmetro escolhido para
282 caracterizar o melhor sobrenadante. Amostra 1: *L. acidophilus* foi cultivado inicialmente
283 em Man Rogosa and Sharpe (MRS) ágar sendo a placa colocada em estufa a 37° C com
284 5-10% de CO₂, por 24 h; Amostra 2: o probiótico foi cultivado em MRS ágar em
285 temperatura ambiente de aproximadamente 25°C, por 24 h; As amostras 3 e 4 foram
286 cultivadas em MRS caldo em estufa a 37° C com 5-10% de CO₂ por 48 h, sendo
287 posteriormente a amostra 3 mantida entre 4 e 8°C por 24h. Após, esses diferentes pré-
288 cultivos do probiótico, foram preparados quatro Erlenmeyers contendo 10 ml de MRS
289 caldo cada um. Das amostras 1 e 2, que foram pré-cultivadas em MRS ágar, foi transferida
290 uma unidade formadora de colônia (UFC) para dois diferentes Erlenmeyer. Das amostras
291 3 e 4, foram transferidos 100µL de cada suspensão para os outros dois Erlenmeyers. Estes
292 todos permaneceram em estufa a 37°C, com 5-10% CO₂, por 48 h ^[17]. Após, cada um dos
293 pré-cultivos foi centrifugado a 4000 g por 20 minutos para a obtenção dos sobrenadantes,

294 os quais foram filtrados, separadamente, com membrana de 0.22 μ m (Millipore Merck®)
295 [18].

296

297 **3.2.3. Quantificação de ácido lático e ácido acético em amostras de sobrenadante** 298 **por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)**

299 Para a quantificação de ácido lático e acético, foram realizadas análises no
300 sobrenadante puro e diluído 1:2 e 1:4 em PBS estéril. As amostras foram analisadas por
301 cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) modelo Prominence equipado com:
302 bomba modelo LC-20AD, forno modelo CTO-20A, detector UV-Vis SPD-20A, injetor
303 automático modelo SIL-20A e sistema de aquisição de dados através do software
304 LabSolutions® (Shimadzu, Japão). A separação cromatográfica foi realizada conforme
305 método descrito pelo fabricante da coluna analítica modelo Aminex® HPX-87H,
306 utilizando como fase móvel ácido sulfúrico 5 mM com vazão de 0,6 mL/min, temperatura
307 do forno de 50 °C, detector em 210 nm e volume de injeção de 20 μ L, com tempo total
308 de análise de 16 minutos (Aminex® HPLC Columns – BIO-RAD®). As curvas analíticas
309 foram construídas a partir de padronização externa, através da diluição do padrão de ácido
310 lático (L (+) Lático Sigma Aldrich®) e ácido acético (Ácido Acético 99.8% Acros
311 Organics®) em concentrações entre 0,5 e 100 mg/L. Os dados de regressão linear foram
312 obtidos com auxílio do software LabSolutions®. As amostras foram diluídas na fase
313 móvel com fator de diluição de 100 vezes (v/v) para se ajustarem a curva analítica.

314

315 **3.2.4. Avaliação do pH do sobrenadante de *L. acidophilus* ATCC 4356**

316 Após ser filtrado, foi separada uma alíquota de 15 ml e verificado o pH no
317 sobrenadante puro e em diluições seriadas de 1:2 a 1:128 com PBS estéril, utilizando
318 pHgâmetro mPA 210 (MS TECNOPON®).

319

320 **3.2.5. Volumetria de oxidorredução para determinação de peróxido de hidrogênio** 321 **(H₂O₂) no sobrenadante**

322 As amostras do sobrenadante puro e diluído 1:2 e 1:4 em PBS estéril foram
323 avaliadas por iodometria [19]. Todas as amostras foram testadas em diferentes
324 concentrações de peróxido de hidrogênio, sendo o primeiro teste realizado com
325 concentração de 140 mg/L e, posteriormente, foi utilizada uma solução diluída dez vezes,
326 ou seja, 14 mg/L. Foram adicionados em um Erlenmeyer: 25 mL do sobrenadante puro;

327 10 mL de H₂SO₄ 2 mols/L; 10 mL de iodeto de potássio (KI) 10%; 3 gotas de molibdato
328 de amônio (NH₄)₆Mo₇O₂₄ 3%. A titulação foi realizada com solução padronizada de
329 tiosulfato de sódio 0,1 mol/L utilizando como indicador uma solução 10% (mm⁻¹) até a
330 solução apresentar cor clara. A solução de tiosulfato de sódio foi padronizada usando
331 uma solução padrão de KIO₃ 0,17 mol/L [20].

332

333 **3.2.6. Avaliação *in vitro* do efeito larvicida do sobrenadante sobre larvas de *T. canis***

334 Amostras do sobrenadante de *L. acidophilus* puro (Sp) ou diluído em PBS (1:2,
335 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128), em volume de 100 µL, foram incubadas com
336 aproximadamente 100 larvas de *T. canis* em 100 µL de meio RPMI 1640 suplementado
337 com penicilina, estreptomicina e fungizona, totalizando um volume de 200 µL/poço [21].
338 Como controle de larvas vivas foram usadas larvas cultivadas em meio RPMI 1640.
339 Como controle de larvas mortas foram usadas larvas congeladas a -20°C, durante dez
340 dias, com posterior choque térmico à 60°C. Foram usadas placas de microcultivo de 96
341 poços (Kasvi®), sendo todos os testes e controles incubados a 37°C, com 5-10% CO₂, por
342 48h, em triplicata. Após as 48h, foi adicionado 100 µL do marcador de viabilidade celular
343 azul de tripan/poço. A placa foi incubada por mais 30 minutos sob as mesmas condições.
344 Após, foi realizada a leitura em microscopia óptica nos aumentos de 100x e 400x
345 avaliando a viabilidade das larvas sendo consideradas larvas vivas as que apresentaram
346 motilidade e ausência de impregnação pelo azul de tripan. As larvas que não apresentaram
347 as características descritas anteriormente, foram consideradas mortas ou inviáveis [7].

348

349 **3.2.7. Análise estatística**

350 Os dados obtidos no teste *in vitro* foram submetidos a análise de variância
351 (ANOVA) e as médias foram comparadas com teste de Tukey com nível de significância
352 de 5% utilizando o software Statistix 10.0.

353

354

355

356

357

358

359

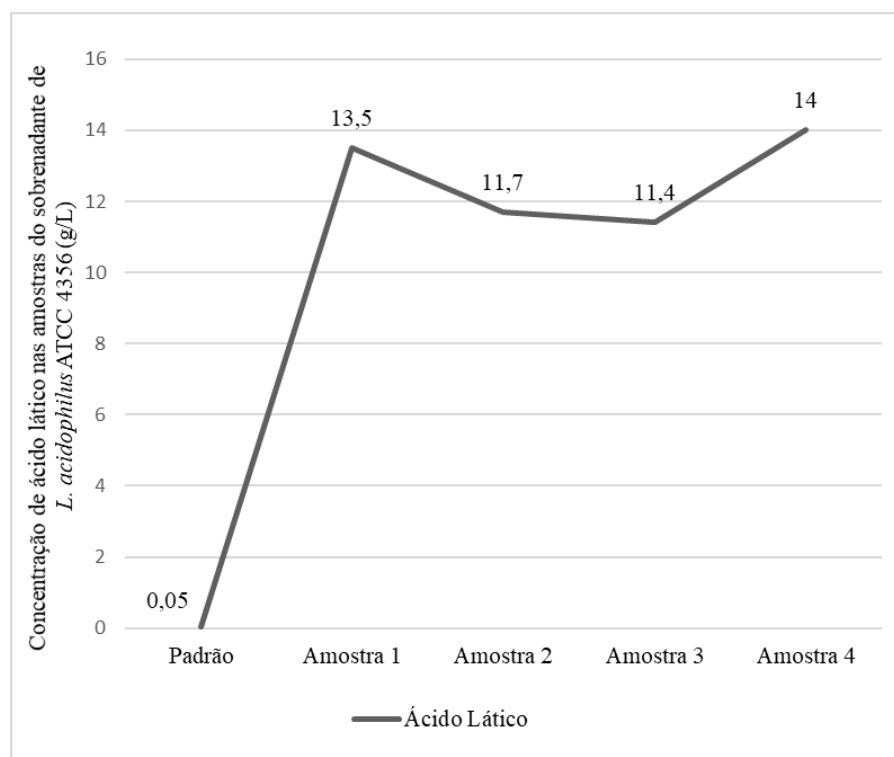
360 3.3. RESULTADOS

361

362 3.3.1. Quantificação dos ácidos lático e acético por cromatografia líquida de alta 363 eficiência (HPLC)

364 Na figura 1 podem ser observados os valores de ácido lático dos quatro diferentes
365 protocolos de cultivo realizados, analisados por HPLC e expressos em g/L. Não foi
366 observada diferença significativa na concentração de ácido lático nos sobrenadantes
367 avaliados, sendo observada uma média de 12,6 g/L. Assim, para as análises subsequentes,
368 optou-se pelo cultivo em MRS caldo, mantido em estufa a 37°C, com 5-10% de CO₂ por
369 48 horas, o qual demonstrou a maior concentração de ácido lático (14 g/L).

370



371

372

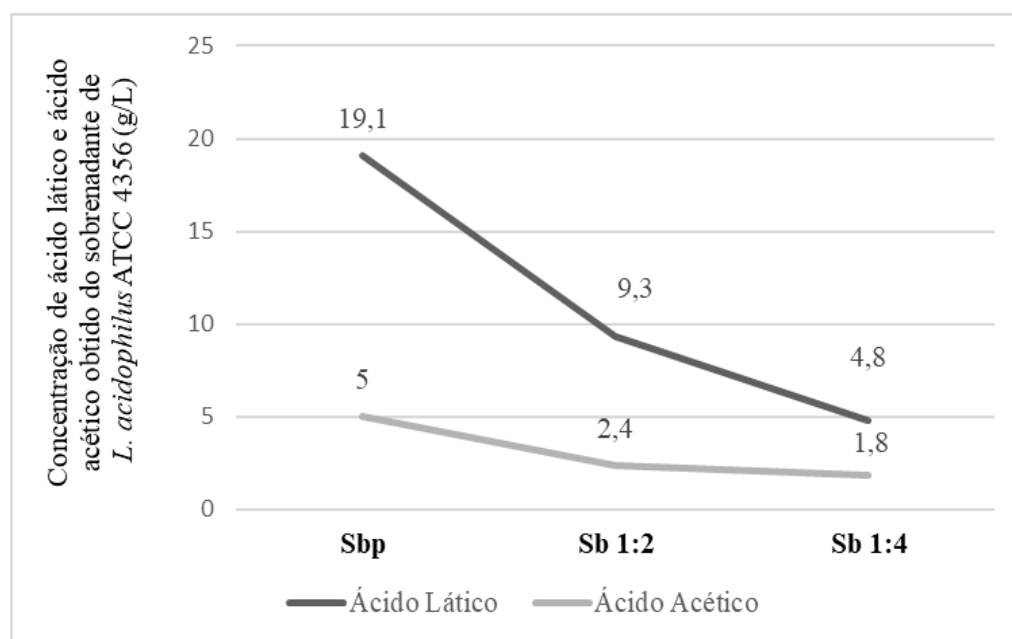
373 **Figura 1.** Quantificação de ácido lático (g/L) em amostras de sobrenadante de
374 *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 cultivados sob diferentes protocolos. As análises
375 foram feitas utilizando uma amostra padrão de ácido lático (L (+) Lático Sigma
376 Aldrich®). As amostras foram obtidas da seguinte maneira: Amostra 1: *L. acidophilus*
377 foi cultivado inicialmente em Man Rogosa and Sharpe (MRS) ágar sendo a placa
378 incubada a 37° C com 5-10% de CO₂, por 24 h; Amostra 2: o probiótico foi cultivado em
379 MRS ágar em temperatura ambiente de aproximadamente 25°C, por 24 h; As amostras 3

380 e 4 foram cultivadas em MRS caldo em estufa a 37° C com 5-10% de CO₂ por 48 h, sendo
381 posteriormente a amostra 3 mantida entre 4 e 8°C por 24h.

382

383 Posteriormente, a fim de avaliar não só a concentração de ácido láctico, mas
384 também de ácido acético, foi realizado um novo cultivo de *L. acidophilus* ATCC4356 de
385 acordo com o protocolo de cultivo previamente selecionado, em meio MRS caldo,
386 incubado em estufa a 37°C, com 5-10% de CO₂ por 48 h. O sobrenadante obtido foi
387 avaliado puro e diluído 1:2 e 1:4 quanto as concentrações de ácido láctico e acético, por
388 HPLC. Nesta segunda análise foi observada uma concentração de ácido láctico mais
389 elevada do que na etapa anterior, chegando a 19 g/L, quando avaliado o sobrenadante
390 puro. Na figura 2 podem ser observados os valores de ácido láctico e ácido acético no
391 sobrenadante, sendo possível observarmos que a concentração é reduzida
392 proporcionalmente à metade quando diluído 1:2 e 1:4.

393



394

395

396 **Figura 2.** Concentração de ácido láctico e ácido acético, por HPLC, em amostras
397 de sobrenadante de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 puro (Sbp) e diluído (Sb) em
398 PBS 1:2 e 1:4.

399

400

401

402

403 **3.3.2. Valores de pH do sobrenadante e diluições**

404 Foi observado um pH ácido de 3,8 quando o sobrenadante foi avaliado puro, não
405 tendo sido observada alteração nesse valor quando analisado nas diluições 1:2 e 1:4.
406 Quando analisadas as diluições 1:8 e 1:16 foi observado pH de 4,0 e 4,6, respectivamente.
407 Nas demais diluições avaliadas, entre 1:32 e 1:128, o pH estava neutro, variando entre
408 6,0 e 6,8.

409

410 **3.3.3. Quantificação de peróxido de hidrogênio através da titulação de** 411 **oxidorredução**

412 A concentração de peróxido de hidrogênio nas amostras do sobrenadante puro e
413 suas respectivas diluições em PBS 1:2 e 1:4 estava abaixo do limite de detecção (LOD)
414 da técnica empregada, sendo estimada em 14mg/L. Considerando este resultado e o fato
415 de nas análises de pH e concentração de ácidos orgânicos os melhores resultados foram
416 obtidos nas diluições até 1:4, e a avaliação de peróxido de hidrogênio não foi realizada
417 em diluições subsequentes.

418

419 **3.3.4. Ação *in vitro* do sobrenadante puro e diluído de *Lactobacillus acidophilus*** 420 **ATCC 4356 sobre larvas de *Toxocara canis***

421

422 Na figura 3 é possível observar que tanto o sobrenadante puro quanto o diluído 1:2
423 promoveu a morte de 100% das larvas de *Toxocara canis*. Em relação as demais diluições
424 (1:4 até 1:128) a viabilidade das larvas foi semelhante ao controle de larvas vivas,
425 variando entre 89,5% à 98,2%, estando estas com presença de motilidade e sem
426 impregnação pelo marcador de viabilidade celular azul de tripan. O controle com larvas
427 viáveis (vivas) e RPMI 1640 apresentou 93,8% de viabilidade. No controle com larvas
428 mortas todas apresentavam ausência de motilidade e estavam impregnadas com azul de
429 tripan.

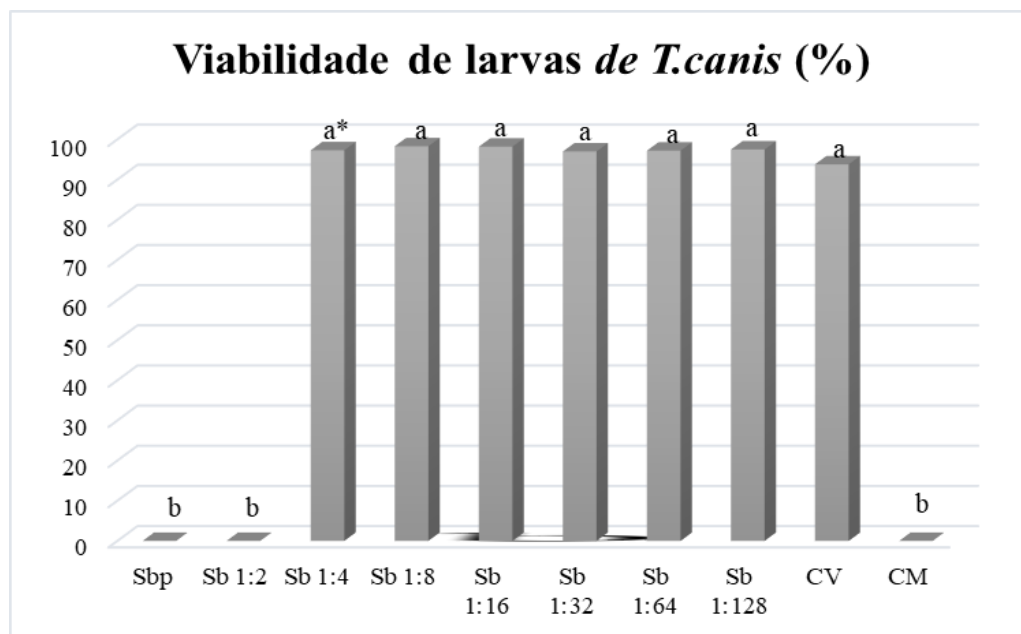
430

431

432

433

434



435

436

437 * Letras diferentes representam significância estatística ($p \leq 0,05$).

438 Sb: Sobrenadante livre de células

439 SbP: Sobrenadante puro de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356

440 CV: Controle vivo

441 CM: Controle morto

442

443 **Figura 3.** Viabilidade (%) das larvas de *Toxocara canis* após cultivo com o
444 sobrenadante puro de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 e diluído (Sb 1:2 até 1:128)

445

446 **3.4. DISCUSSÃO**

447 O efeito benéfico do uso de sobrenadantes de cultivo de *Lactobacillus* spp. contra
448 agentes infecciosos como bactérias, fungos e protozoários têm sido demonstrado [23-25].
449 No presente estudo verificamos que o sobrenadante de *L. acidophilus* ATCC 4356 foi
450 capaz de inviabilizar 100% das larvas de *T. canis* mesmo quando testado diluído 1:2.
451 Esses resultados corroboram com Walcher et al., (2023) que observaram que o
452 sobrenadante puro desse mesmo probiótico inviabilizou 100% das larvas de *Toxocara*
453 *canis* [9]. Em outro estudo, foi evidenciado o efeito antiparasitário do sobrenadante puro
454 de *Lactobacillus rhamnosus*, o qual inibiu 100% da esporulação de oocistos de *Eimeria*
455 spp., e quando diluído 1:2, 1:4 e 1:8 inibiu 76%, 54% e 37%, respectivamente [23]. No
456 presente estudo, a diluição do sobrenadante a partir de 1:4 não demonstrou efeito
457 larvicida, provavelmente devido à alteração das características do meio e concentração
458 reduzida de determinados metabólitos presentes.

459 Considerando que a presença de metabólitos como proteínas, ácidos graxos,
460 peróxido de hidrogênio e o baixo pH do sobrenadante estão entre os principais fatores
461 relacionados ao efeito deletério sobre patógenos [24 -25], foram avaliadas algumas dessas
462 características no sobrenadante de *L. acidophilus* ATCC 4356, a fim de observar se
463 poderiam estar envolvidas no efeito larvicida sobre *T. canis*. No presente estudo, foi
464 possível observar uma importante acidez do sobrenadante de *L. acidophilus* ATCC 4356
465 com pH de 3,8 o qual se manteve inalterado mesmo após ser diluído em solução salina
466 até 1:4. Embora tenha havido aumento, manteve-se com característica ácida até a diluição
467 1:16. Esses resultados corroboram com o observado com o sobrenadante de *L. johnsonii*
468 LJO02 o qual apresentou um pH ácido de 4,3 o que estaria relacionado à diminuição da
469 aderência e da formação de biofilme por *Staphylococcus aureus* [26], assim como à
470 inibição do crescimento de *Streptococcus mutans*, agente causador de cárie em seres
471 humanos [27]. Em outro estudo, que avaliou a ação de sobrenadantes de *L. acidophilus*
472 ATCC 4356, *L. casei* ATCC 393 e *L. reuteri* ATCC 23272 sobre *Acinetobacter*
473 *baumannii*, foi observado que o pH ácido, variando entre 3,9 e 4,2 estaria relacionado a
474 inibição da formação de biofilme sobre esta bactéria responsável por infecções
475 hospitalares. [29]. A ação do pH foi observada em estudo no qual o sobrenadante de
476 *Lactobacillus* spp. com pH de 3,5 inibiu a formação de biofilme de *Vibrio cholera*,
477 havendo perda do efeito quando o pH foi neutralizado [30]. Sobre o protozoário *Giardia*
478 *duodenalis* a utilização de sobrenadante obtido a partir de um mix de probióticos, dentre
479 estas algumas espécies de *Lactobacillus*, está relacionada à inibição da adesão e
480 multiplicação de trofozoítos, havendo perda do efeito antiparasitário quando o pH do
481 sobrenadante foi ajustado para 7,0 [31]. Além disso, valores de pH ácido dos sobrenadantes
482 de *Lactobacillus* spp., foram correlacionados com a forma ativa de metabólitos como
483 ácidos lático, acético e proteínas [32].

484 Os ácidos orgânicos presentes no sobrenadante de probióticos do gênero
485 *Lactobacillus* são derivados da fermentação de carboidratos, com um destaque para o
486 ácido lático [33], sendo também evidenciados os ácidos: acético, propiônico, butírico [34],
487 cítrico, málico e succínico [35, 36]. Como principal mecanismo de ação desses ácidos
488 orgânicos está a diminuição do pH intestinal, tornando o ambiente inóspito para
489 patógenos [37]. No presente estudo foram observadas concentrações expressivas de ácido
490 lático e o ácido acético, 19,1g/L e 5,0 g/L, respectivamente. Concentrações semelhantes
491 de ácido lático (20- 27g/L) e ácido acético (3,5 a 3,9 g/L) estão relacionadas à inibição

492 do crescimento de patógenos intestinais como as bactérias da família Enterobacteriaceae
493 [38]. Além disso, concentrações de ácido láctico (7,8 g/L) e ácido acético (11,2 g/L) no
494 sobrenadante de *Lactobacillus brevis* estão relacionadas à ação larvicida sobre
495 *Meloidogyne incognita* e *M. javanica*, nematódeos de plantas [39]. Mesmo em
496 concentrações menores de ácido láctico (4,3 g/L) este estaria relacionado à ação anti-
497 aflatoxigênica sobre *Aspergillus flavus*, importante fungo produtor de aflatoxinas que
498 contaminam alimentos [40].

499 Outro importante metabólito presente no sobrenadante de *Lactobacillus* é o
500 peróxido de hidrogênio, o qual também apresenta efeito antimicrobiano, principalmente
501 contra bactérias Gram negativas, comprometendo a integridade da parede celular [41].
502 Sobre *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. e *Staphylococcus aureus*, a baixa concentração de
503 peróxido de hidrogênio produzida por *Lactobacillus crispatus* 35A-TV tornou estas
504 bactérias mais sensíveis aos antibióticos testados [42-43]. No presente estudo, a
505 quantificação de peróxido de hidrogênio no sobrenadante de *L. acidophilus* ATCC 4356
506 foi inferior a 14mg/L. Concentrações de peróxido de hidrogênio entre 12–94,6 mg/L,
507 presentes no sobrenadante de *L. rhamnosus*, *L. salivarius*, *L. gasseri*, *L. plantarum*, *L.*
508 *vaginalis*, *L. delbrueckii* e *L. fermentum* estão relacionadas à diminuição dos riscos de
509 infecções bacterianas e virais na microbiota vaginal humana [44].

510 A observação de que o sobrenadante puro e diluído 1:2 promoveram a morte *in*
511 *vitro* de 100% das larvas de *T. canis*, sugere que o efeito larvicida esteja relacionado a
512 uma maior concentração de metabólitos ativos. A partir dos resultados obtidos sugere-se
513 que o pH abaixo de 4 e concentrações dos ácidos láctico e acético a partir de 9,3 g/L e 2,4
514 g/L são importantes para o efeito larvicida sobre *T. canis*. A observação de que o efeito
515 larvicida do sobrenadante se mantém mesmo após a diluição, sugere uma maior chance
516 deste sobrenadante promover também uma ação larvicida *in vivo*.

517 **Agradecimentos:** Agradecimento a Faculdade de Medicina e ao Programa de
518 Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Rio Grande (FURG)
519 na realização do estudo. Agradecimento a Escola de Química e Alimentos da
520 Universidade Federal do Rio Grande e ao Centro Integrado de Análises pela colaboração
521 na realização desse estudo. Agradecimentos a Coordenação de Aperfeiçoamento de
522 Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa durante o mestrado.

523 **Conflitos de Interesse:** Não houve conflito de interesses por parte dos autores.

524 **Contribuição dos Autores:** **Carolina Netto de Oliveira da Cunha:**
525 Conceitualização, Análise de resultados, Administração do projeto. **Stéfani Rodeghiero**
526 **Collares:** Metodologia. **Débora Carvalho Rodrigues:** Metodologia, **Débora Liliane**
527 **Walcher:** Metodologia. **Micaele Quintana de Moura:** Metodologia e Análise
528 estatística. **Lourdes Helena Rodrigues Martins:** Metodologia. **Gabriel Baracy Klafke:**
529 Análise estatística. **Jean Lucas de Oliveira Arias:** Metodologia. **Rodolfo Carapelli:**
530 Metodologia. **João Batista do Santos Espinelli Junior:** Metodologia. **Carlos James**
531 **Scaini:** Conceitualização, Análise de resultados. **Luciana Farias da Costa de Avila:**
532 Conceitualização, Análise de resultados, Administração do projeto.

533

534

535

536

537

538

539

540

541

542

543

544

545

546

547

548

549

550

551

552

553

554 **3.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

555

556 1. SCHNIEDER, Thomas et al. Larval development of *Toxocara canis* in dogs.
557 Veterinary Parasitology, v. 175, n. 3-4, p. 193-206, fev. 2011. Disponível em:
558 <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.10.027>.

559

560 2.FELIX, Dryellen Aparecida da Silva et al. *Toxocara* spp., Larva migrans visceral e
561 Saúde Pública: revisão. Pubvet: Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 14, n. 12, p. 1-8,
562 dez. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.31533/pubvet.v14n12a719.1-8>.

563

564 3.HEALY, Sara R. et al. Brain food: rethinking food-borne toxocariasis. Parasitology, v.
565 149, n. 1, p. 1-9, out. 2021. Disponível em:
566 <http://dx.doi.org/10.1017/s0031182021001591>.

567

568 4.GIUDICE, Paula Andreia Fabris et al. Serosurvey and associated risk factors of anti-
569 *Toxocara* spp. antibodies in bovines from slaughterhouses of southeastern Brazil.
570 Parasites & Vectors, v. 14, n. 1, p. 1-9, 11 maio 2021. Disponível em:
571 <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-021-04755-w>.

572

573 5. MOREIRA, Gustavo Marçal Schmidt Garcia et al. Human toxocariasis: current
574 advances in diagnostics, treatment, and interventions. Trends In Parasitology, v. 30, n. 9,
575 p. 456-464, set. 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2014.07.003>.

576

577 6. VIOLA, Gabriela R. et al. Poliartrite crônica como manifestação isolada da toxocaríase.
578 Revista Brasileira de Reumatologia, v. 56, n. 2, p. 185-187, mar. 2016. Disponível em:
579 <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbr.2014.07.005>.

580

581 7. CHIODO, P.G. et al. *In Vitro* and *In Vivo* Effects of *Enterococcus faecalis* CECT7121
582 on *Toxocara canis*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v.105, P.615–20, ago. 2010. Disponível
583 em: <https://doi.org/10.1590/s0074-02762010000500003>.

584

585 8. CRUZ, L.A.X. et al. *Saccharomyces boulardii* reduces the vertical transmission of
586 *Toxocara canis* larvae in mice. Journal Of Helminthology, v. 95, p. 1-5, 2021. Disponível
587 em: <http://dx.doi.org/10.1017/s0022149x20001030>.

588

589 9. WALCHER, Débora Liliane et al. Larvicide activity of *Lactobacillus* spp. and
590 *Saccharomyces boulardii* supernatants on *Toxocara canis*. Journal of Parasitology, v.
591 109, n. 1, p. 15-19, jan. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1645/20-161>.

592

593 10. BELGUESMIA, Yanath et al. Adsorbed on Alginate Nanoparticles are very Active
594 against *Escherichia coli*. International Journal Of Molecular Sciences, v. 21, n. 22, p.
595 8654, nov. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21228654>.

596

597 11. ABDUL-RAHIM, Omar et al. Phenyl-Lactic Acid is an Active Ingredient in
598 Bactericidal Supernatants of *Lactobacillus crispatus*. Journal Of Bacteriology, v. 203, n.
599 19, p. 1-10, set. 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/jb.00360-21>.

600

601

602

- 603 12. DIVYASHREE, S. et al. Probiotic properties of *Lactobacillus casei* – MYSRD 108
604 and *Lactobacillus plantarum*-MYSRD 71 with potential antimicrobial activity against
605 *Salmonella paratyphi*. Biotechnology Reports, v. 32, p. 1-12, dez. 2021. Disponível em:
606 <http://dx.doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00672>.
607
- 608 13. QIAN, Zhixiang et al. Probiotic *Lactobacillus* sp. strains inhibit growth, adhesion,
609 biofilm formation, and gene expression of Bacterial Vaginosis-Inducing *Gardnerella*
610 *vaginalis*. Microorganisms, v. 9, n. 4, p. 1-16, 31 mar. 2021. Disponível em:
611 <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms9040728>.
612
- 613 14. MANN, Soyon et al. Oral probiotic activities and biosafety of *Lactobacillus gasseri*
614 HHuMIN D. Microbial Cell Factories, v. 20, n. 1, p. 1-24, mar. 2021. Disponível em:
615 <http://dx.doi.org/10.1186/s12934-021-01563-w>.
616
- 617 15. HERSHBERGER, P.K et al. Susceptibility of *Nanophyetus salmincola* cercariae to
618 formalin, hydrogen peroxide and seawater. Journal Aquatic Animal Health, v.31, n.1,
619 p.56-60, dez.2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/aah.10050>.
620
- 621 16. CARDOSO, Paula Dutra et al. *Saccharomyces boulardii* reduces the mean intensity
622 of infection in mice caused by the consumption of liver contaminated by *Toxocara canis*.
623 Parasitology Research, v. 119, n. 3, p. 1161-1165, dez. 2019. Disponível em:
624 <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-019-06567-5>.
625
- 626 17. SAVIGNY, De. *In vitro* maintenance of *Toxocara canis* larvae and a simple method
627 for the production of *Toxocara* ES Antigen for use in Serodiagnostic Tests for Visceral
628 Larva Migrans. The Journal Of Parasitology, v. 61, n. 4, p. 781-782, ago. 1975.
629 Disponível em: <http://www.jstor.org/stable/3279492>.
630
- 631 18. CADORE, Priscila Silva et al. Protective effect of the probiotic *Lactobacillus*
632 *acidophilus* ATCC 4356 in BALB/c mice infected with *Toxocara canis*. Revista do
633 Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 63, n. 9, p. 1-6, nov.2021. Disponível em:
634 <http://doi.org/10.1590/S1678-9946202163009>.
635
- 636 19. DANILOVA, T. A et al. Antimicrobial Activity of Supernatant of *Lactobacillus*
637 *plantarum* against Pathogenic Microorganisms. Bulletin Of Experimental Biology and
638 Medicine, v. 167, n. 6, p. 751-754, out. 2019. Disponível em:
639 <https://doi.org/10.1007/s10517-019-04615-9>.
640
- 641 20. SANTASALO-AARNIO, Annukka et al. New analytical methodology for analysing
642 S(IV) species at low pH solutions by one stage titration method (bichromatometry) with
643 a clear colour change. Could potentially replace the state-of-art-method iodometry at low
644 pH analysis due higher accuracy. Plos One, v. 12, n. 11, p. 1-15, nov. 2017. Disponível
645 em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0188227>.
646
- 647 21. BACCAN, Nivaldo; ANDRADE, João Carlos de; GODINHO, Oswaldo E. S.;
648 BARONE, José Salvador. Química Analítica Quantitativa Elementar. 3. ed. São Paulo:
649 Blucher, 2001.
650
651

- 652 22. AVILA, Luciana Farias Da Costa de et al. Protective Effect of the Probiotic
653 *Saccharomyces boulardii* in *Toxocara canis* infection is not due to direct action on the
654 larvae. Revista do Instituto De Medicina Tropical de São Paulo, v. 55, n. 5, p.363-365,
655 set. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0036-46652013000500012>.
656
657
- 658 23. MOLAN, Abdul-Lateef. Bacteria versus parasites: Effect of *Lactobacillus rhamnosus*
659 cell free supernatant on the sporulation of coccidian oocysts *in vitro* and *in vivo*. Journal
660 Of Dental And Medical Sciences, v. 13, n. 6, p. 86-92, jun. 2014. Disponível em:
661 <http://www.iosrjournals.org>.
662
- 663 24. ALLONSIUS, Camille Nina et al. Inhibition of *Candida albicans* morphogenesis by
664 chitinase from *Lactobacillus rhamnosus* GG. Scientific Reports, v. 9, n. 1, p. 1-12, 27
665 fev. 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-39625-0>.
666
- 667 25. FUOCHI, Virginia et al. Metabolic Characterization of Supernatants Produced by
668 *Lactobacillus* spp. with *in vitro* Anti-*Legionella* Activity. Frontiers In Microbiology, v.
669 10, p. 1-11, 26 jun. 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2019.01403>.
670
- 671 26. SQUARZANTI, Diletta Francesca et al. An animal derivative-free medium enhances
672 *Lactobacillus johnsonii* LJO02 supernatant selective efficacy against the methicillin
673 (oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* virulence through key-metabolites. Scientific
674 Reports, v. 12, n. 1, p. 1-14, mai. 2022. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1038/s41598-](http://dx.doi.org/10.1038/s41598-022-12718-z)
675 [022-12718-z](http://dx.doi.org/10.1038/s41598-022-12718-z).
676
- 677 27. WASFI, Reham et al. Probiotic *Lactobacillus* sp. inhibit growth, biofilm formation
678 and gene expression of caries-inducing *Streptococcus mutans*. Journal Of Cellular And
679 Molecular Medicine, v. 22, n. 3, p. 1-12, 8 jan. 2018. Disponível em:
680 <http://dx.doi.org/10.1111/jcmm.13496>.
681
- 682 28. BABRUD, Betesho et al. The effect of *Lactobacillus reuteri* cell free supernatant on
683 growth and biofilm formation of *Paenibacillus larvae*. Iranian Journal Of Veterinary
684 Research, v. 20, n. 3, p. 192-198, jan. 2019. Disponível em:
685 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6811706/pdf/ijvr-20-192.pdf>.
686
- 687 29. STANBRO, Josh et al. Topical Delivery of *Lactobacillus* Culture Supernatant
688 Increases Survival and Wound Resolution in Traumatic *Acinetobacter baumannii*
689 Infections. Probiotics And Antimicrobial Proteins, v. 12, n. 3, p. 809-818, nov. 2019.
690 Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s12602-019-09603-z>.
691
- 692 30. KAUR, S. et al. Anti-biofilm Properties of the Fecal Probiotic *Lactobacilli* Against
693 *Vibrio* spp. Front. Cell. Infect. Microbiol. v.8, n.120, p. 1-14, abr. 2018. Disponível em:
694 <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00120>.
695
- 696 31. PERRUCCI, Stefania et al. *In vitro* and *ex vivo* evaluation of the anti-*Giardia*
697 *duodenalis* activity of the supernatant of Slab51 (SivoMixx). Plos One, v. 14, n. 3, p.1-
698 16, mar. 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0213385>.
699
700

- 701 32. SALARI, Samira et al. Antifungal effects of *Lactobacillus acidophilus* and
702 *Lactobacillus plantarum* against different oral *Candida* species isolated from HIV/ AIDS
703 patients: an *in vitro* study. Journal Of Oral Microbiology, v. 12, n. 1, p. 1-10, jan. 2020.
704 Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/20002297.2020.1769386>.
705
- 706 33. ADETOYE, Adewale et al. Characterization and anti-*Salmonella* activities of lactic
707 acid bacteria isolated from cattle faeces. Bmc Microbiology, v. 18, n. 1, p. 1-11, ago.
708 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s12866-018-1248-y>.
709
- 710 34. RISHI, Lavanya et al. Melioration in Anti-*Staphylococcal* Activity of Conventional
711 Antibiotic(s) by Organic Acids Present in the Cell Free Supernatant of *Lactobacillus*
712 *paraplantarum*. Indian Journal Microbiology, v. 57, n. 3, p. 1-6, set. 2017. Disponível
713 em: <https://doi.org/10.1007/s12088-017-0659-z>.
714
- 715 35. CHEN, Chen et al. The role of *Bacillus acidophilus* in osteoporosis and its roles in
716 proliferation and differentiation. Journal Of Clinical Laboratory Analysis, v. 34, n. 11, p.
717 1-10, ago. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/jcla.23471>.
718
- 719 36. SIDDIQUE, Abubakar et al. *Lactobacillus reuteri* and *Enterococcus faecium* from
720 Poultry Gut Reduce Mucin Adhesion and Biofilm Formation of Cephalosporin and
721 Fluoroquinolone-Resistant *Salmonella enterica*. Animals, v. 11, n. 12, p. 1-21, dez. 2021.
722 Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/ani11123435>.
723
- 724 37. ADITYA, Arpita; PENG, Mengfei; YOUNG, Alana; BISWAS, Debabrata.
725 Antagonistic Mechanism of Metabolites Produced by *Lactobacillus casei* on Lysis of
726 Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Frontiers In Microbiology, v. 11, p. 1-13, nov. 2020.
727 Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2020.574422>.
728
- 729 38. CHEN, Chi-Chung et al. Antimicrobial ability and mechanism analysis of
730 *Lactobacillus* species against carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Journal of
731 Microbiology, Immunology and Infection, v. 54, n. 3, p. 447-456, jun. 2021. Disponível
732 em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmii.2020.01.005>.
733
- 734 39. SEO, Hye Jeong et al. Biological Control of Root-Knot Nematodes by Organic Acid-
735 Producing *Lactobacillus brevis* WiKim0069 Isolated from Kimchi. The Plant Pathology
736 Journal, v. 35, n. 6, p. 662-673, dez. 2019. Disponível em:
737 <http://dx.doi.org/10.5423/ppj.oa.08.2019.0225>.
738
- 739 40. GUIMARÃES, Ana et al. Anti-aflatoxigenic effect of organic acids produced by
740 *Lactobacillus plantarum*. International Journal Of Food Microbiology, v. 264, p. 31-38,
741 jan. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.10.025>.
742
- 743 41. SGIBNEV, Andrey; KREMLEVA, Elena. Influence of Hydrogen Peroxide, Lactic
744 Acid, and Surfactants from Vaginal *Lactobacilli* on the Antibiotic Sensitivity of
745 Opportunistic Bacteria. Probiotics & Antimicro. v.9, n.2, p. 131-141, nov. 2016.
746 Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12602-016-9238-6>.
747
- 748 42. SCILLATO, Marina et al. Antimicrobial properties of *Lactobacillus* cell-free
749 supernatants against multidrug-resistant urogenital pathogens. Microbiologyopen, v. 10,
750 n. 2, p. 1-16, abr. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mbo3.1173>.

751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787

43. GEORGIEVA, Ralitsa et al. Antimicrobial activity and antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* spp. intended for use as starter and probiotic cultures. Biotechnology & Biotechnological Equipment, v. 29, n. 1, p. 84-91, dez. 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/13102818.2014.987450>.

44. PAWAR, Krupali; ARANHA, Clara. *Lactobacilli* metabolites restore E-cadherin and suppress MMP9 in cervical cancer cells. Current Research In Toxicology, v. 3, p.1-9, 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.crtox.2022.100088>.

788 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

789

790 Observamos a importância do sobrenadante obtido a partir do cultivo das
791 subespécies de *Lactobacillus*, sendo importante ressaltar a ampla variedade de estudos
792 realizados com os metabólitos produzidos por estes, principalmente contra fungos,
793 bactérias, protozoários e helmintos patogênicos que afetam a saúde humana e animal.

794 No presente estudo, tivemos a oportunidade de avaliar alguns metabólitos
795 presentes no sobrenadante de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 como o ácido lático,
796 ácido acético e peróxido de hidrogênio bem como mensurar o pH do sobrenadante puro
797 e diluído em solução salina, e observamos a partir do estudo *in vitro* a inviabilização das
798 larvas de *Toxocara canis* em 100% no sobrenadante puro e na diluição 1:2.

799 Entretanto, são necessários mais estudos que avaliem os metabólitos
800 separadamente, a influência do pH sobre as larvas de *T. canis* para elucidar os
801 mecanismos de ação desses metabólitos sobre esse parasito. Além disso estudos em
802 modelos experimentais murinos avaliando a ação do sobrenadante de *Lactobacillus*
803 *acidophilus* ATCC 4356 sobre a toxocaríase, são sugeridos como novos estudos.

804

805

806

807

808

809

810

811

812

813

814

815

816

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADETOYE, Adewale et al. Characterization and anti-salmonella activities of lactic acid bacteria isolated from cattle faeces. *Bmc Microbiology*, v. 18, n. 1, p. 1-11, ago. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1248-y>.

AVILA, Luciana Farias da Costa de et al. *Saccharomyces boulardii* Reduces Infection Intensity of Mice with Toxocariasis. *Veterinary Parasitology*, v. 187, n. 1-2, p.337-340, jun. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.01.002>.

AVILA, Luciana Farias da Costa de et al. Protective Effect of the Probiotic *Saccharomyces boulardii* in *Toxocara canis* Infection is not due to Direct Action on the Larvae. *Revista Do Instituto De Medicina Tropical De São Paulo*, v. 55, n. 5, P.363-365, set. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0036-46652013000500012>.

AVILA, L. F. D. C. De et al. Modulation of IL-12 and IFN γ by Probiotic Supplementation Promotes Protection Against *Toxocara canis* Infection In Mice. *Parasite Immunology*, v. 38, N. 5, P.326-330, 28 abr. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/pim.12314>.

CADORE, Priscila Silva et al. Protective effect of the probiotic *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 in BALB/c mice infected with *Toxocara canis*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Rio Grande*, v. 63, n. 9, p. 1-6, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10517-019-04615-9>.

CDC Division of Parasitic Diseases, National Center for Infectious Diseases Center for Disease Control and Prevention (2019). IOP Publishing Physics web. Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/toxocariasis>.

CHEN, Rui-Cong et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG supernatant promotes intestinal barrier function, balances T reg and T H 17 cells and ameliorates hepatic injury in a mouse model of chronic-binge alcohol feeding. *Toxicology Letters*, v. 241, p. 103-110, jan. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.11.019>.

CHEN, Jia et al. Toxocariasis: a silent threat with a progressive public health impact. *Infectious Diseases Of Poverty*, v. 7, n. 1, p. 1-13, 13 jun. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40249-018-0437-0>.

CHEN, Chi-Chung et al. Antimicrobial ability and mechanism analysis of *Lactobacillus* species against carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, v. 54, n. 3, p. 447-456, jun. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2020.01.005>.

CHIEFF, Pedro Paulo et al. Human Toxocariasis: 2010 to 2020 Contributions from Brazilian Researchers. *Research and Reports in Tropical Medicine*, v. 12, n. 1, p. 81-91, mai. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/rrtm.s274733>.

CHIODO, P.G. et al. *In Vitro And In Vivo* Effects of *Enterococcus faecalis* CECT7121 on *Toxocara canis*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v.105, P.615–20, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0074-02762010000500003>.

DIAS, Priscila Alves et al. Atividade Antimicrobiana de Microrganismos Isolados de Grãos De Kefir. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Pelotas, v. 19, n. e-40548, p. 1-8, fev. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/1809-6891v19e-40548>.

FAO/WHO. World Health Organization. Joint FAO/WHO Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, 2001.

FAN, C.-K. et al. Factors affecting disease manifestation of toxocarosis in humans: Genetics and environment. Veterinary Parasitology, v.4, n. 193, p. 342-352. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.030>.

FRANTZ, Fabiani G. et al. Coinfection does not Affect Therapeutic Effect of a DNA Vaccine in Mice Harboring Tuberculosis. Plos Neglected Tropical Disease, v.4, n.6, p. 1-10, jun.2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000700>.

FIALHO et al. Chapter Eighteen - Seroprevalence Brazil. In: Dwight Bowman; Hardcover. 1st Edition. Advances in Parasitology. *Toxocara* and Toxocariasis. v 191, 357–374, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2020.01.013>.

FOSTER, James C. et al. Efeito de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* na viabilidade de oocistos de *Cryptosporidium parvum*., v.20, n.3, p.351-357, 2003. Disponível em: <http://www.elsevier.nl/locate/jnlabr/yfmic>.

GASSER, Robin B. et al. A perfect time to harness advanced molecular technologies to explore the fundamental biology of *Toxocara* species. Veterinary Parasitology, v. 193, n. 4, p. 353-364, abr. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.031>.

GONG, Zheng et al. Arginine- and Polyamine-Induced Lactic Acid Resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. Plos One, v. 11, n. 1, p. 1-15, jan. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147637>.

HOLLAND, C. V. Knowledge Gaps In The Epidemiology of *Toxocara*: The Enigma Remains. Parasitology, v. 144, n. 1, P. 81-94, dez. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/s0031182015001407>.

HOMBU, Amy et al. Treatment of larva migrans syndrome with long-term administration of albendazole. Journal of Microbiology, Immunology and Infection, v. 52, n. 1, p. 100-105, fev. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2017.07.002>.

JEYANATHAN, Augustina et al. *Lactobacillus* cell-free supernatant as a novel bioagent and biosurfactant against *Pseudomonas aeruginosa* in the prevention and treatment of orthopedic implant infection. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, v. 109, n. 10, p. 1634-1643, fev. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34821>.

KRALIK P, BABAK V and DZIEDZINSKA. The Impact of the Antimicrobial Compounds Produced by Lactic Acid Bacteria on the Growth Performance of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *Front. Microbiol.*, v.9, n.638, p.1-7, abr. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00638>.

KIM, Sam Woong et al. Potential of cell-free Supernatant from *Lactobacillus plantarum* NIBR97, including novel bacteriocins, as a natural alternative to chemical disinfectants. *Pharmaceuticals*, v. 13, n.10, p. 1-13, set. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ph13100266>.

KOHLER, Liza Ingrid Acha et al. Concurrent visceral and ocular involvement in *Toxocara canis* infection and pharmacodermia. *Sociedade Brasileira de Clínica Médica*, v. 15, n. 2, p. 112-115, abr-jun. 2017.

JANG, Sung J. et al. Vaginal *Lactobacilli* inhibit growth and hyphae formation of *Candida albicans*. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 1-9, maio 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44579-4>.

LENZMEIER, Taylor D. et al. Application of *Lactobacillus gasseri* 63 AM supernatant to *Pseudomonas aeruginosa*-infected wounds prevents sepsis in murine models of thermal injury and dorsal excision. *Journal Of Medical Microbiology*, v. 68, n. 10, p. 1560-1572, 1 out. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001066>.

LIPÍŃSKA, Lidia et al. Antifungal Activity of *Lactobacillus pentosus* ŁOCK 0979 in the Presence of Polyols and Galactosyl-Polyols. *Probiotics And Antimicrobial Proteins*, v. 10, n. 2, p. 186-200, 6 nov. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9344-0>.

LIM, Hae-soon et al. Characterization of Antibacterial Cell-Free Supernatant from Oral Care Probiotic *Weissella cibaria*, CMU. *Molecules*, v. 23, n. 8, p. 1-13, ago. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules23081984>.

LIU, Qing et al. Surface components and metabolites of probiotics for regulation of intestinal epithelial barrier. *Microbial Cell Factories*, v. 19, n. 1, p. 1-11, fev. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12934-020-1289-4>.

MA, Guangxu et al. Human Toxocariasis. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 18, n. 1, p. 14-24, jan. 2018. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(17\)30331-6](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(17)30331-6).

MACPHERSON, Calum N.L et al. The Epidemiology And Public Health Importance Of Toxocariasis: A Zoonosis Of Global Importance. *International Journal For Parasitology*, v. 43, n. 12-13, p. 999-1008, nov. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.07.004>.

MANN, Soyon et al. Oral probiotic activities and biosafety of *Lactobacillus gasseri* HHuMIN D. *Microbial Cell Factories*, v. 20, n. 1, p. 1-24, mar. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01563-w>.

MARCO, Stefania et al. Probiotic Cell-Free Supernatants Exhibited Anti-Inflammatory and Antioxidant Activity on Human Gut Epithelial Cells and Macrophages Stimulated with LPS. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, v. 2018, p.1-12, 4 jul. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2018/1756308>.

MARKOWIAK-KOPEC, Paulina et al. The Effect of Probiotics on the Production of Short-Chain Fatty Acids by Human Intestinal Microbiome. Nutrients, v. 12, n. 4, p. 1-23, 16 abr. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu12041107>.

MAZUR-MELEWSKA, K. et al. Production of interleukins 4 and 10 in children with hepatic involvement in the course of *Toxocara* spp. infection. Parasite Immunology, v. 38, n.2, p.101–107, fev.2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/pim.12303>.

MERIGUETI, Yslla F. et al. Dispersion and infectivity of *Toxocara canis* eggs after passage through chicken intestine. Parasitology Research, v.117, n.11, p. 3481-3486, nov.2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00436-018-6045-x>.

MOLAN, Abdul-Lateef. Bacteria versus parasites: Effect of *Lactobacillus rhamnosus* cell free supernatant on the sporulation of coccidian oocysts *in vitro* and *in vivo*. Journal Of Dental And Medical Sciences, v. 13, n. 6, p. 86-92, jun. 2014. Disponível em: <http://www.iosrjournals.org>.

NARDINI, Paola et al. *Lactobacillus crispatus* inhibits the infectivity of *Chlamydia trachomatis* elementary bodies, *in vitro* study. Scientific Reports, v. 6, n. 1, p. 1-11, 29 jun. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep29024>.

NOROOZI, Elham et al. Physico-chemical and cytotoxic analysis of a novel large molecular weight bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* TA0021. Iranian Journal of Microbiology, v. 11, n. 5, p. 397-405, out. 2019. Disponível em: <http://ijm.tums.ac.ir>.

PAROLIN, Carola et al. *Lactobacillus* Biofilms Influence Anti-*Candida* Activity. Frontiers In Microbiology, v. 12, p. 1-11, 29 out. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.750368>.

PAPAVASILOPOULOS, Vasilios et al. Soil contamination by *Toxocara canis* and human seroprevalence in the Attica region, Greece. Germs, v. 8, n. 3, p. 155-161, set. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.18683/germs.2018.1143>.

PLAZA-DIAZ, Julio et al. Mechanisms of Action of Probiotics. Advances in Nutrition, v. 10, n. 1, p. 49-66, 1 jan. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/advances/nmy063>.

PERRUCCI, S et al. *In vitro* and *ex vivo* evaluation of the anti-*Giardia duodenalis* activity of the supernatant of Slab51 (SivoMixx). Plos One, v.14, n.3, p. 1-16, mar 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213385>.

QIAO, Nanzhen et al. A comparison of the inhibitory activities of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* against *Penicillium expansum* and an analysis of potential antifungal metabolites. Fems Microbiol Lett, v. 18, n. 130, p. 1-27, set. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa130>.

RANA, Shikha et al. PH-dependent inhibition of AHL-mediated quorum sensing by cell-free supernatant of lactic acid bacteria in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbial Pathogenesis*, v. 142, p. 1-8, mai.2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104105>.

RAISSI, Vahid et al. Expression of Mir-21 and Mir-103a in *Toxocara canis*: Potential for Diagnosis of Human Toxocariasis. *Iran Journal Parasitology*, v. 15, n.4, p. 559-567, out-dez.2022. Disponível em: <https://doi.org/10.18502/ijpa.v15i4.4865>.

RISHI, Lavanya et al. Melioration in Anti-*Staphylococcal* activity of conventional antibiotic(s) by organic acids present in the cell free supernatant of *Lactobacillus paraplantarum*. *Indian Journal Of Microbiology*, v. 57, n. 3, p. 359-364, 11 jul. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12088-017-0659-z>.

ROLDÁN, W. H. Deglycosylation of *Toxocara* excretory-secretory antigens improves the specificity of the serodiagnosis for human toxocariasis. *Parasite Immunology*, v. 37, p. 557-567, ago. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/pim.12248>.

ROLDÁN, W. H., ELEFANT, G. R., & FERREIRA, A. W. Immunoglobulin M Antibodies are not Specific for Serodiagnosis of Human Toxocariasis. *Parasite Immunology*, v.39, n.8, p.1-25, 22 jun 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/pim.12447>.

ROSTAMI, Ali et al. Chapter Twenty-Eight - Global prevalence of *Toxocara* infection in dogs Seroprevalence Brazil. In: Dwight Bowman; Hardcover. 1st Edition. *Advances in Parasitology. Toxocara and Toxocariasis*. v 109, 561–583, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2020.01.017>.

RYU, Eun Hye et al. Purification and characterization of antifungal compounds from *Lactobacillus plantarum* HD1 isolated from kimchi. *Food Microbiology*, v. 41, p. 19-26, ago. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.01.011>.

SALARI, Samira et al. Antifungal effects of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus plantarum* against different oral *Candida* species isolated from HIV/ AIDS patients: an in vitro study. *Journal of Oral Microbiology*, v. 12, n. 1, p. 1-10, 1 jan. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/20002297.2020.1769386>.

SARACINO, Maria Priscila et al. Searching for the one(s): using probiotics as anthelmintic treatments. *Frontiers In Pharmacology*, v. 12, p. 1-14, 9 ago. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.714198>.

SANTOS, LMD et al., Sensitivity and specificity of recombinant proteins in *Toxocara* spp. for serodiagnosis in humans: Differences in adult and child populations. *Plos One*, v.13, n.12, p. 1-10, mar. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213830>.

SCHWARTZ, Regan et al. The epidemiology and control of *Toxocara canis* in puppies. *Parasite Epidemiology and Control*, v. 16, p. 1-8, fev. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2021.e00232>.

SCILLATO, Marina et al. Antimicrobial properties of *Lactobacillus* cell-free supernatants against multidrug-resistant urogenital pathogens. *Microbiologyopen*, v. 10, n. 2, p. 1-16, abr. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mbo3.1173>.

SHAHANDASHTI, Roya V. et al. The inhibitory effect of bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 and *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 on planktonic cells and biofilms of *Serratia marcescens*. *Turkish Journal of Medical Sciences*, v. 46, p. 1188-1196, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3906/sag-1505-51>.

SGIBNEV, Andrey; KREMLEVA, Elena. Influence of Hydrogen Peroxide, Lactic Acid, and Surfactants from Vaginal *Lactobacilli* on the Antibiotic Sensitivity of Opportunistic Bacteria. *Probiotics & Antimicro*. v.9, n.2, p. 131-141, nov. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12602-016-9238-6>.

SCHURER, Janna M. et al. Toxoplasmosis and Toxocariasis: an assessment of human immunodeficiency virus comorbidity and health-care costs in Canada. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 95, n. 1, p. 168-174, 6 jul. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0729>.

TYUNGU, Donna L. et al. *Toxocara* species environmental contamination of public spaces in New York City. *Plos Neglected Tropical Diseases*, v. 14, n. 5, p. 1-13, maio 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008249>.

WAINDOK, Patrick; STRUBE, Christina. Neuroinvasion of *Toxocara canis* and *T. cati* larvae mediates dynamic changes in brain cytokine and chemokine profile. *Journal Of Neuroinflammation*, v. 16, n. 1, p. 2-12, 17 jul. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1537-x>.

WALCHER, Débora Liliane et al. *Lactobacillus rhamnosus* reduces parasite load on *Toxocara canis* experimental infection in mice, but has no effect on the parasite *in vitro*. *Parasitology Research*, v. 117, n. 2, P.597-602, dez. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5712-7>.

WALCHER, Débora Liliane. Avaliação do efeito de *Lactobacillus acidophilus* em camundongos infectados por *Toxocara canis* e da ação larvívora *in vitro* de diferentes probióticos e seus sobrenadantes. 2019. 70 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

WILKINS, P. P. Immunodiagnosis of Human Toxocariasis and Prospects for Improved Diagnostics. *Current Tropical Medicine Reports*, v. 1, n.1, p. 44-51, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40475-013-0001-8>.

XU, Hui et al. Protective Effect of *Lactobacillus rhamnosus* GG and its supernatant against myocardial dysfunction in obese mice exposed to intermittent hypoxia is associated with the activation of Nrf2 pathway. *International Journal Of Biological Sciences*, v. 15, n. 11, p. 2471-2483, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.7150/ijbs.36465>.

