JULIANA DUARTE GUERREIRO ALDARVIS

**Avaliação dos possíveis mecanismos de ação dos probióticos contra *Candida*
spp. isoladas de usuários de próteses totais**

São Paulo

2013

JULIANA DUARTE GUERREIRO ALDARVIS

**Avaliação dos possíveis mecanismos de ação dos probióticos contra *Candida*
spp. isoladas de usuários de próteses totais**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas.

Área de Concentração: Prótese Dentária

Orientador: Profa. Dra. Tomie Toyota de Campos

São Paulo

2013

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Aldarvis, Juliana Duarte Guerreiro.

Avaliação dos possíveis mecanismos de ação dos probióticos contra *Candida* spp. isoladas de usuários de próteses totais / Juliana Duarte Guerreiro Aldarvis; orientador Tomie Toyota de Campos. -- São Paulo, 2013.

125 p.: il. : fig., tab.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Prótese Dentária. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Probióticos. 2. Candida. 3. Lactobacillus. 4. Estomatite sob Prótese. 5. Microbiologia Oral. I. Campos, Tomie Toyota. II. Título.

Aldarvis JDG. Avaliação dos possíveis mecanismos de ação dos probióticos contra *Candida* spp. isoladas de usuários de próteses totais. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Aos meus pais, Joberto e Rosana, por terem enraizado em mim os valores que me trouxeram até aqui.

Ao meu marido, Raphael, com amor e gratidão pela paciência e pelo apoio neste período em que estive tão ausente.

À minha querida irmã, Jaqueline, por trilhar comigo este difícil caminho.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo e à sua Faculdade de Odontologia, especialmente ao Departamento de Prótese pela oportunidade de realizar esta pesquisa.

Ao programa de pós-graduação da FOUSP- Ciências Odontológicas, na pessoa do Prof. Dr. Marcelo Bonecker.

À Profa. Dra. Tomie Toyota de Campos, minha orientadora. Obrigada pelas palavras de incentivo, pela confiança e por seu olhar encorajador.

Ao Prof. Dr. Atlas Edson Moleros Nakamae, obrigada por ver em mim, lá no projeto Bandeira Científica, um potencial que nem eu sabia que tinha. Obrigada por todo conhecimento transmitido, por toda a confiança, oportunidade e amizade. Você me ensinou não só Odontologia e Ciência, mas lições para toda a vida.

À Profa. Dra. Regina Tamaki, por todo o carinho, atenção e conhecimento transmitidos.

Ao Prof. Dr. Roberto Yamada, meu eterno professor de bancada, por toda atenção, por dividir em tantas tardes sua sala e por todo o conhecimento e experiências transmitidos.

À Profa. Dra. Maria Cecília Milluzi Yamada, obrigada pelos conselhos, pelo apoio e incentivo, por seu exemplo de vida e por toda a formação em Prótese Total.

Ao Prof. Dr. Vyto Kiausinis, por também dividir sua sala comigo, por todos os puxões de orelha, literalmente, e por toda a formação em Prótese Total.

Ao Prof. Dr. Marcelo Bonecker, por ter aceitado ser meu primeiro orientador no programa de pós-graduação em 2011.

À Profa. Dra. Alyne Simões Gonçalves, pelo apoio ao emprestar seu laboratório no início do experimento, enquanto providenciávamos os aparelhos para o departamento de prótese. Por fazer parte da banca de qualificação. Obrigada pelas valiosas sugestões.

Ao Prof. Dr. Eriques Gonçalves da Silva, por me ensinar trabalhar no laboratório de leveduras patogênicas com paciência e dedicação.

Ao colega Rafael Martinez, por tantas trocas de experiências e por estar sempre aberto a sanar minhas dúvidas sobre seus trabalhos.

À Karin, por sonhar e delinear este projeto comigo, parte por parte, por toda ajuda e por me ensinar tantas coisas.

À Tatiana, minha companheira de laboratório, obrigada por cada momento em que estivemos ali, dividindo cada centímetro do nosso pequeno laboratório. Por cada noite na qual uma não deixava o cansaço da outra vencer a batalha.

Aos meus colegas de disciplina: Carol, Roger, Jun, Wallace, Priscila, Danilo, Vitor e Flávio por tantos momentos, especialmente os reconfortantes almoços, e pela valiosa troca de experiências.

Aos funcionários de Departamento de Prótese, as secretárias Sandra, Coraci e Marlete e os técnicos Neizinha, Luís e Paula, por toda atenção, dedicação e disponibilidade. Em especial, aos dois últimos, por dividirem o laboratório e o seu “mau cheiro” comigo.

À Bibliotecária Glauci por revisar a formatação da dissertação.

Às funcionárias do Serviço de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, Alessandra Moreira de Lima e Cátia Tiezzi dos Santos.

À Danisco Brasil, na pessoa de Antônio Salles, pela doação das cepas probióticas.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

A Deus, pois sua força e sabedoria me abriram os olhos para a ciência.

Aos meus pais pelo amor incondicional, pelo incentivo e pelo apoio, inclusive financeiro, para que este projeto fosse realizado.

Ao meu marido Raphael, pela paciência, pela ajuda e apoio, por acreditar em mim, me incentivar e me encorajar, mesmo nos momentos mais difíceis. Obrigada pela estatística e pelas traduções.

À Erika, por ser meu braço direito, e às vezes o esquerdo também! Obrigada por tudo que resolveu por mim neste período. Sem sua ajuda seria muito difícil.

A toda minha Família, Guerreiros e Aldarvis, por compreenderem com tanto carinho a minha ausência em tantos almoços, jantares e viagens neste período.

A todos que contribuíram para a execução deste trabalho, meu MUITO OBRIGADA!

“Por vezes, sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Tereza de Calcutá)

RESUMO

Aldarvis JDG. Avaliação dos possíveis mecanismos de ação dos probióticos contra *Candida* spp. isoladas de usuários de próteses totais [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2013. Versão Corrigida.

O objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* os mecanismos de ação coagregação, produção de peróxido de hidrogênio e ácidos orgânicos por probióticos no combate ao crescimento de *Candida* spp. A Estomatite sob Prótese é uma das infecções que acomete a mucosa oral, nas áreas recobertas por próteses, como resultado de condições locais ou sistêmicas que alteram a microbiota do hospedeiro, podendo estar associada à presença de *Candida*. O tratamento com antifúngicos tópicos é amplamente difundido para tratar candidose, porém algumas cepas de *Candida* se tornaram resistentes aos fármacos mais utilizados devido ao seu uso indiscriminado. Alguns trabalhos mostraram inibição do crescimento de *Candida* por probióticos, mas não se sabe ao certo quais mecanismos de ação agem nesta inibição. Para esta investigação foram utilizadas 77 amostras de leveduras isoladas de usuários de próteses totais, 4 cepas *Candida* ATCC, e 3 cepas de *Lactobacillus*. Realizou-se os testes de inibição de *Candida* por probióticos, produção de peróxido de hidrogênio e ácidos orgânicos, coagregação, curva de crescimento e inibição por ácido láctico. Os resultados demonstraram a produção de H_2O_2 pelos lactobacilos, porém este mecanismo não pôde ser destacado como o responsável pela inibição. Os índices de coagregação obtiveram coeficiente de correlação $r = 0,5$ com a capacidade de inibição dos micro-organismos. Houve intensa produção de ácidos orgânicos em culturas e co-culturas, de acordo com a cepa de lactobacilo presente. A presença de *Candida* não alterou as contagens de UFC dos lactobacilos. Já a presença de lactobacilos provocou redução nas contagens de *Candida*, especialmente *C. albicans* e *C. dubliniensis*. As curvas de crescimento e de pH mostraram que o comportamento das co-culturas é semelhante ao das culturas de lactobacilos. A análise de pH mostrou que a acidificação ocorreu em todas as culturas, porém *L. rhamnosus* promoveram uma maior acidificação. Concluímos que o ácido láctico é o mecanismo de ação mais importante dentre os estudados, sendo capaz de reduzir a contagem de UFC e alterar as curvas de crescimento de *C. albicans* e *C.*

dublinsiensis e que a inibição ocorre através de múltiplos fatores que podem variar de acordo com as espécies de leveduras e lactobacilos presentes.

Palavras- chave: Probióticos. *Candida*. *Lactobacillus*. Estomatite sob Prótese.

ABSTRACT

Aldarvis JDG. Evaluation of possible action mechanisms by probiotics against *Candida* spp. isolated from complete dentures users [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2013. Versão Corrigida.

This work objective was to evaluate *in vitro* the action mechanisms of coaggregation, hydrogen peroxide production and organic acids in preventing the growth of *Candida* spp.. The denture stomatitis is one of the infection types that affect the oral mucosa, in the area covered by prosthesis as a result of local or systemic conditions that changes the bacterial microbiota of the hostess, usually associated with the presence of *Candida*. The treatment using topical antifungal agents is widely spread to treat candidosis. However, some of the *Candida* strains became resistant to the most used drugs because of its indiscriminate use. Some pieces of work revealed success in preventing the growth of *Candida* by probiotics, but it is still unknown which mechanisms act on this exhibition. For this investigation there have been used 77 yeast samples isolated from total prosthesis users, being 4 ATCC strains of *Candida*, and 3 strains of *Lactobacillus*. There have been run inhibition tests of *Candida* by probiotics, hydrogen peroxide and organic acids production, coaggregation, growth curve and lactic acid inhibition. The results detect the H₂O₂ production by lactobacilli; however this mechanism could not be highlighted as the responsible for the inhibition observed. The coaggregation indexes showed correlation coefficients of $r = 0.5$ with the microorganisms inhibition capacity. There has been intensive organic acid production in cultures and co-cultures, according to the present lactobacilli strain. *Candida* presence did not alter the lactobacilli UFC count, whereas the lactobacilli presence caused reduction in *Candida* count, especially *C. albicans* and *C. dubliniensis*. The growth curves and pH showed that the behavior of co-cultures is similar to the lactobacilli cultures. The pH analysis showed that acidification occurred for all cultures; nevertheless, *L. rhamnosus* has promoted a greater acidification. We concluded that lactic acid is the most important mechanism among the studied ones, being capable of reducing UFC count and shifting the growth curves for *C. albicans* and *C. dubliniensis*. Furthermore, we concluded that the inhibition occurs through multiple factors that may vary according to the present yeast and lactobacilli species.

Keywords: Probiotics. *Candida*. *Lactobacillus*. Denture Stomatitis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1 -	Placas preparadas com o inóculo de <i>Lactobacillus</i> em meio de ágar MRS <i>Lactobacilli</i> 42
Figura 4.2 -	Corte de 2 cm no meio inoculado após incubação por 24h a 37°C em aerobiose 42
Figura 4.3 -	Preenchimento das placas com meio fundido de ASD 43
Figura 4.4 -	Placas após a solidificação do ASD nivelado ao MRS inoculado com lactobacilo. 43
Figura 4.5 -	Semeadura em superfície, com auxílio de swab de algodão para a realização do teste de inibição por probióticos 44
Figura 4.6 -	Resultados do teste de inibição: inibição total, inibição parcial e nenhuma inibição 44
Figura 4.7 -	Tira específica impregnada com peroxidase (Merckoquant Peroxide Test; Merck, Darmstadt, Alemanha)..... 45
Figura 4.8 -	Escala para medição de peróxido de hidrogênio com tira impregnada com peroxidase 45
Figura 4.9 -	Leituras do teste de produção de peróxido de hidrogênio, com auxílio de tira impregnada por peroxidase 46
Figura 4.10 -	Meios inoculados sendo distribuídos em placas de 24 poços com lâminulas redondas para o teste de coagregação 47
Figura 4.11 -	Microfotografias (magnificação 40X) mostrando a coagregação entre <i>Lactobacillus</i> e <i>Candida</i> segundo a escala de Reid et al.(1990): (1) <i>L. acidophilus</i> NCFM e <i>C. albicans</i> (A42); (2) <i>L. acidophilus</i> NCFM e <i>C. dubliniensis</i> (A47); (3) <i>L. acidophilus</i> NCFM e <i>C. albicans</i> 10231; (4) <i>L. rhamnosus</i> Lr-32 e <i>C. dubliniensis</i> (A47) 48

Figura 4.12 -	Espectrofotômetro utilizado para ajustar a absorbância das culturas a $DO_{495nm} = 1\text{Å}$	49
Figura 4.13 -	Tubos com inóculos foram centrifugados a 4000 rpm (1800 X g)....	50
Figura 4.14 -	Alteração da cor do meio acrescido de fenolftaleína de acordo com sua alcalinidade	50
Figura 4.15 -	A mistura sendo titulada com NaOH (1 N)	50
Figura 4.16 -	Esquema da titulação ácido-base	51
Figura 4.17 -	Esquema das diluições seriadas.....	53
Figura 4.18 -	Técnica da gota de 25µl para semeadura em ASD	53
Figura 4.19 -	Esquema das semeaduras do teste de crescimento	54
Figura 4.20 -	Contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) por ml de <i>Candida</i> após a incubação por 24h	54
Figura 4.21 -	Amostras acondicionadas em cuvetas para a medição da sua absorbância (DO_{495nm}) através do espectrofotômetro	55
Figura 4.22 -	Detalhe de uma amostra de <i>L. rhamnosus</i> Lr-32 e <i>C. dubliniensis</i> , identificada como L47, em T=24h e o controle de MRS caldo (M). A absorbância medida neste caso foi 1.042Å (DO_{495nm}).....	55
Figura 4.23 -	Medição do pH das amostras	56
Figura 4.24 -	Ajuste do pH das culturas de <i>Candida</i> através do acréscimo de ácido láctico.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 -	Distribuição de frequência de nenhuma inibição, inibição parcial e total das espécies de <i>Candida</i> pelos lactobacilos testados58
Tabela 5.2 -	Probabilidade de <i>Candida</i> spp. serem inibidas por qualquer uma das cepas de <i>Lactobacillus</i> estudadas, segundo o teste <i>t-student</i>60
Tabela 5.3 -	Produção de Peróxido de Hidrogênio por <i>Lactobacillus</i> em culturas puras (mg/l).....61
Tabela 5.4 -	Produção de Peróxido de hidrogênio detectada nas co-culturas (mg/l)..... 62
Tabela 5.5 -	Índices de coagregação obtidos com <i>Lactobacillus</i> spp. e <i>Candida</i> spp. após 4h de incubação Produção de Peróxido de hidrogênio detectada nas co-culturas (mg/l] a 37°C, de acordo com a classificação proposta por Reid et al. (1990)63
Tabela 5.6 -	Coeficiente de correlação para Índices de Coagregação e Probabilidade de Inibição entre <i>Lactobacillus</i> e <i>Candida</i> 64
Tabela 5.7 -	Produção de Ácidos Orgânicos* nas culturas puras de <i>Lactobacillus</i> e em suas co-culturas com <i>Candida</i> spp65
Tabela 5.8 -	Variação de pH de culturas puras e co-culturas conforme o tempo.72
Tabela 5.9 -	Variação de Absorbância (Å)* de culturas puras e co-culturas conforme o tempo 76
Tabela 5.10 -	Valores de pH obtidos nas culturas de <i>L. rhamnosus</i> Lr-32 com as cepas de <i>Candida</i> avaliadas no teste de crescimento 79

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 5.1 -	Contagem de UFC das populações de <i>L. rhamnosus</i> Lr-32 em cultura pura e co-culturas com <i>Candida</i> spp.....	67
Gráfico 5.2 -	Contagem de UFC das populações de <i>L. rhamnosus</i> HN001-Howaru® em cultura pura e co-culturas com <i>Candida</i> spp.....	67
Gráfico 5.3 -	Contagem de UFC das populações de <i>L. acidophilus</i> NCFM em cultura pura e co-culturas com <i>Candida</i> spp.....	68
Gráfico 5.4 -	Contagem de UFC das populações de <i>C. albicans</i> 10231 em cultura pura e co-culturas com <i>Lactobacillus</i>	68
Gráfico 5.5 -	Contagem de UFC das populações de <i>C. albicans</i> 90028 em cultura pura e co-culturas com <i>Lactobacillus</i>	69
Gráfico 5.6 -	Contagem de UFC das populações de <i>C. glabrata</i> 15126 em cultura pura e co-culturas com <i>Lactobacillus</i>	69
Gráfico 5.7 -	Contagem de UFC das populações de <i>C. krusei</i> 6258 em cultura pura e co-culturas com <i>Lactobacillus</i>	70
Gráfico 5.8 -	Contagem de UFC das populações de <i>C. albicans</i> (A42) em cultura pura e co-culturas com <i>Lactobacillus</i>	70
Gráfico 5.9 -	Contagem de UFC das populações de <i>C. dubliniensis</i> (A47) em cultura pura e co-culturas com <i>Lactobacillus</i>	71
Gráfico 5.10 -	Contagem de UFC das populações de <i>C. albicans</i> (A53) em cultura pura e co-culturas com <i>Lactobacillus</i>	71
Gráfico 5.11 -	Alteração do pH das culturas de <i>L. rhamnosus</i> Lr-32 e <i>C. albicans</i> (A42) longo do tempo.....	74
Gráfico 5.12 -	Alteração do pH das culturas de <i>L. rhamnosus</i> HN001- Howaru® e <i>C. albicans</i> (A42) ao longo do tempo.	74

Gráfico 5.13 -	Alteração do pH das culturas de <i>L. acidophilus</i> NCFM e <i>C. albicans</i> (A42) ao longo do tempo.....	75
Gráfico 5.14 -	Curvas de Crescimento das culturas de <i>L. rhamnosus</i> Lr-32 e <i>C. albicans</i> 90028.....	79
Gráfico 5.15 -	Curvas de Crescimento das Culturas de <i>C. albicans</i> (A42) no teste de inibição por ácido láctico	80
Gráfico 5.16 -	Curvas de Crescimento das Culturas de <i>C. dubliniensis</i> (A47) no teste de inibição por ácido láctico	80
Gráfico 5.17 -	Curvas de Crescimento das Culturas de <i>C. albicans</i> (A53) no teste de inibição por ácido láctico	81
Gráfico 5.18 -	Curvas de Crescimento das Culturas de <i>C. albicans</i> 10231 no teste de inibição por ácido láctico	81
Gráfico 5.19 -	Curvas de Crescimento das Culturas de <i>C. albicans</i> 10231 no teste de inibição por ácido láctico	81
Gráfico 5.20 -	Curvas de Crescimento das Culturas de <i>C. albicans</i> 90028 no teste de inibição por ácido láctico	82
Gráfico 5.21 -	Curvas de Crescimento das Culturas de <i>C. glabrata</i> 15126 no teste de inibição por ácido láctico	82
Gráfico 5.22 -	Curvas de Crescimento das Culturas de <i>C. krusei</i> 6258 no teste de inibição por ácido láctico	82
Gráfico 5.23 -	Contagem de log UFC/ml das culturas de <i>C. albicans</i> (A42)	83
Gráfico 5.24 -	Contagem de log UFC/ml das culturas de <i>C. dubliniensis</i> (A47)	84
Gráfico 5.25 -	Contagem de log UFC/ml das culturas de <i>C. albicans</i> (A53)	84
Gráfico 5.26 -	Contagem de log UFC/ml das culturas de <i>C. albicans</i> 10231	84

Gráfico 5.27 - Contagem de log UFC/ml das culturas de <i>C. albicans</i> 90028.....	85
Gráfico 5.28 - Contagem de log UFC/ml das culturas de <i>C. glabrata</i> 15126.....	85
Gráfico 5.29 - Contagem de log UFC/ml das culturas de <i>C. krusei</i> 6258.	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	micrograma
µl	microlitro
Å	Ângström
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASD	Ágar Saboraud Dextrose
BAL	bactéria ácido-láctica
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
C.	<i>Candida</i>
cm	centímetro
DO	Densidade Óptica
E.	<i>Enterococcus</i>
EP	Estomatite sob Prótese
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
g	grama
g	força g
h	hora
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
IFN	Interferon
IL	Interleucina
L.	<i>Lactobacillus</i>
l	litro
mg	miligrama
ml	mililitro
MRS	Man, Rogosa & Sharpe
NaOH	Hidróxido de Sódio
pH	potencial hidrogeniônico
rpm	rotações por minuto
S.	<i>Streptococcus</i>
SPSS	<i>Statistical Package of Social Scienses</i>
t	tempo

TMB	tetrametilbenzidina
UFC	Unidade Formadora de Colônia
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
γ	gama
®	<i>registered sign</i>
°C	graus Celsius
α	alfa
r	coeficiente de correlação de Pearson

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 CANDIDOSE	23
2.1.1 Manifestações clínicas da doença	23
2.2 <i>Candida</i> – PATOGENIA	29
2.3 PROBIÓTICOS	30
2.4 PROBIÓTICOS E <i>Candida</i>	33
2.4.1 Mecanismos de ação	37
2.4.1.1 Peróxido de hidrogênio	37
2.4.1.2 Ácidos Orgânicos	38
2.4.1.3 Capacidade de Coagregação	39
3 OBJETIVOS	40
3.1 OBJETIVO GERAL	40
3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	40
3.3 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS	40
4 MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 AMOSTRAS	41
4.2 TESTES	42
4.2.1 Teste de inibição de <i>Candida</i> por probióticos	42
4.2.2 Teste de produção de peróxido de hidrogênio	44
4.2.3 Teste de coagregação	47
4.2.4 Ensaios de produção de ácidos orgânicos	48
4.2.5 Teste de curva de crescimento, medição de pH e quantificação em UFC de <i>Candida</i> e <i>Lactobacillus</i>	51
4.2.6 Teste de Inibição por ácido láctico	56
4.3 ANÁLISE DE DADOS	57
5 RESULTADOS	58
5.1 TESTE DE INIBIÇÃO DE <i>Candida</i> POR PROBIÓTICOS	58
5.1.1 Análise de Dados	59
5.2 TESTE DE PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO	61
5.2.1 Análise de Dados	62

5.3 TESTE DE COAGREGAÇÃO	63
5.3.1 Análise de Dados	64
5.4 ENSAIOS DE PRODUÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS	64
5.4.1 Análise de Dados	66
5.5 TESTE DE CURVA DE CRESCIMENTO, MEDIÇÃO DE PH E QUANTIFICAÇÃO EM UFC DE <i>Candida</i> E <i>Lactobacillus</i>	66
5.5.1 Quantificação em UFC de <i>Candida</i> e <i>Lactobacillus</i>	66
5.5.1.1 Análise de Dados	71
5.5.2 Medição de pH	72
5.5.2.1 Análise de Dados	75
5.5.3 Curva de Crescimento	76
5.5.3.1 Análise de Dados	78
5.6 TESTE DE INIBIÇÃO POR ÁCIDO LÁCTICO	79
5.6.1 Curvas de Crescimento	80
5.6.1.1 Análise de Dados	83
5.6.2 Contagem de UFC	83
5.6.2.1 Análise de Dados	86
6 DISCUSSÃO	87
7 CONCLUSÕES	96
REFERÊNCIAS	91
APÊNDICES	110

1 INTRODUÇÃO

A Estomatite sob Prótese (EP) é uma das infecções que acomete a mucosa oral, nas áreas recobertas por próteses, como resultado de condições locais ou sistêmicas que alteram a microbiota bacteriana do hospedeiro, podendo apresentar aspectos eritematosos uniformes difusos, hiperplasias papilomatosas [1] e desconforto local [2-8].

Normalmente a EP está associada com a presença *Candida* [9-11], chega a ter taxas de incidência de até 70% em idosos que utilizam próteses totais, o que faz da estomatite protética uma doença bastante comum [10, 12,13]. A essa alta incidência, alguns autores atribuem a dificuldade encontrada pelos idosos em realizar a higienização destas próteses [1, 10, 14-19], a imunidade salivar reduzida nesta faixa etária [6], o fato de a doença ser multifatorial e destes fatores afetarem diferentemente os diversos grupos populacionais [14].

O tratamento com antifúngicos tópicos é amplamente difundido para tratar candidose [5, 20, 21], porém algumas cepas de *Candida* se tornaram resistentes aos fármacos mais utilizados devido ao seu uso indiscriminado [16, 22, 23].

Buscando alternativas ao uso dos antifúngicos, alguns trabalhos mostraram sucesso na prevenção e no tratamento da candidose através de uma terapia alternativa com bactérias probióticas [2, 12-15, 18, 19, 24-31]. Estas bactérias auxiliam o corpo humano a se proteger das infecções, especialmente nas superfícies mucosas e no trato gastrointestinal [32, 33]. Os resultados destes estudos mostram a inibição do crescimento de *Candida* por probióticos, mas não se sabe ao certo quais mecanismos de ação agem nesta inibição [19, 24, 29, 34].

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar os possíveis mecanismos de ação das bactérias probióticas que impedem o crescimento de *Candida* sp.

Faz-se necessário entender os mecanismos de ação para otimizar a utilização desta terapia e compreender suas indicações.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CANDIDOSE

A candidose bucal é uma infecção oportunista desta cavidade que ocorre devido ao supercrescimento de micro-organismos do gênero *Candida* [5]. Os sintomas mais comuns da doença são: desconforto local, sensação de paladar alterado e, até mesmo, disfagia [5].

Esta infecção pode surgir como resultado de condições locais ou sistêmicas que alteram a microbiota bacteriana do hospedeiro [2, 6-8]. Sua incidência varia dependendo da idade e de alguns fatores predisponentes. Estes fatores incluem: função alterada das glândulas salivares, uso prolongado de medicamentos (antibióticos de amplo espectro, esteroides e psicotrópicos), próteses (antigas e/ou mal adaptadas), dieta rica em carboidratos, tabagismo, diabetes *mellitus*, Síndrome de *Cushing*, tumores malignos, condições imunossupressoras (radioterapia, quimioterapia, infecções por HIV) e idade (recém-nascidos ou idade avançada) [3, 5, 6, 8, 22, 24, 35-37].

Devido a estes fatores muitos pacientes idosos, hospitalizados por infecções sistêmicas, desenvolvem a candidose bucal e conseqüentemente disfagia. Nestes casos, a candidose oral pode resultar em deficiência nutricional, comprometendo a recuperação destes pacientes [5, 16, 38].

2.1.1 Manifestações clínicas da doença

Considerada a infecção fúngica humana mais comum [2, 39], a candidose é classificada, pela Estomatologia, como: Candidose pseudomembranosa, caracterizada por extensas pseudomembranas brancas [2, 5, 6, 9]; Candidose atrófica aguda, ou eritematosa, associada com uma sensação queimação na boca ou na língua [2, 5, 9]; Candidose hiperplásica crônica ocorre em mucosa bucal ou borda lateral da língua como salpicado homogêneo ou lesões brancas [2, 5, 9];

Glossite romboide mediana, ou atrofia papilar central, ocorre devido à perda, ou atrofia, das papilas filiformes nesta área [2, 5]; Queilite angular caracterizada por fissuras eritematosas em um ou ambos os cantos da boca, e geralmente associada a uma infecção intraoral por *Candida* [2, 5]. Candidose atrófica crônica, também conhecida como "Estomatite sob Prótese" ou "Estomatite Protética" [2] caracterizada por eritema crônico localizado nas mucosas recobertas por próteses, sendo mais frequente na maxila [3, 4], podendo apresentar aspectos eritematosos uniformes difusos e hiperplasias papilomatosas [1]. Sua etiologia é multifatorial, e pode ser associada a fatores locais e sistêmicos [10].

É importante salientar, que a Estomatite sob Prótese nem sempre está associada à presença de *Candida*. Esta lesão eritematosa, observada geralmente no palato duro sob uma prótese total, tem causa multifatorial [10, 11, 40]. Seu aparecimento pode estar associado à utilização de próteses antigas mal adaptadas [41, 42], ou a presença de um biofilme inespecífico [17]. Porém, a presença da levedura é considerada o fator mais importante no seu surgimento [9-11] enquanto os outros fatores, como trauma, higiene deficiente, uso contínuo da prótese, doenças sistêmicas e deficiências imunológicas teriam um papel secundário [9, 11]. Assim, a Candidose atrófica crônica, manifesta-se como estomatite sob prótese e, neste trabalho, esses dois termos serão utilizados como sinônimos.

Os diferentes graus de inflamação palatal, que podem ocorrer como resultado do uso de próteses, são normalmente associados a presença de um grande número de micro-organismos do gênero *Candida* no espaço entre a mucosa que recobre o palato e a superfície da prótese [11, 36, 40], sendo assim as próteses funcionam como um reservatório onde estes micro-organismos se proliferam causando a infecção [43, 44].

Isto pode ser devido à adesão aumentada de *Candida* sp. ao acrílico [42, 44, 45], ao fluxo de saliva reduzido sob as superfícies da prótese, à má adaptação das próteses totais, ao uso noturno e à deficiência na higiene oral [3, 11, 36]. As superfícies ásperas das próteses, especialmente na região que recobre o palato, tendem a favorecer o desenvolvimento do biofilme uma vez que nestas superfícies é mais difícil a eliminação de micro-organismos. Além disso, as superfícies ásperas proporcionam uma maior área de superfície e um ambiente mais protegido para que o biofilme se desenvolva [17]. Os revestimentos macios ou "softs" e os materiais

condicionantes de tecidos também têm sido apontados como favoráveis à proliferação destes fungos, predispondo o indivíduo a infecções [46].

Darwazeh et al. encontraram nos dedos de usuários de próteses totais as mesmas leveduras que isolou de suas próteses, comprovando que as próteses não só foram colonizadas pelas leveduras como também foram capazes de transmitir o agente patógeno a outras regiões do corpo [47].

As espécies de *Candida* mais prevalentes em candidose bucal são *C. albicans* [4, 5, 10, 32, 39, 42, 46, 48, 49], *C. glabrata* [4, 46, 50], *C. tropicalis* [46], *C. pseudotropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *C. stellatoidea* [5, 7] e *C. dubliniensis* [51, 52].

Além de ser a espécie mais prevalente, *C. albicans* também é a mais virulenta quando comparada a *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. pseudotropicalis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* e *C. glabrata* [53].

Al-Karaawi et al. avaliaram pacientes dentados e usuários de próteses quanto a presença de *Candida* em suas cavidades orais, e não foi observada diferença na quantidade de colônias (em UFC/ml) encontradas entre os dois grupos. Porém, os usuários de próteses totais ou parciais apresentaram um número maior de espécies de *Candida* em sua cavidade oral do que os pacientes dentados. Houve um destaque para a presença de *C. dubliniensis* em pacientes entre 40 e 50 anos e, uma vez que os pacientes deste estudo não eram imunocomprometidos, a incidência desta espécie foi associada a fatores predisponentes locais como o uso das próteses [54]. Outros estudos demonstraram que embora a *C. albicans* seja a espécie mais prevalente, em usuários de próteses colonizações com mais de uma espécie de *Candida* são mais comuns [41, 51, 55].

Barbeau et al. avaliaram a presença de *Candida albicans* e estomatite em usuários de próteses. Uma maior colonização de leveduras associada a uma intensa placa de cobertura foi encontrada nas próteses dos indivíduos com os maiores graus de inflamação. Entre os fatores de risco, o uso noturno das próteses e o tabagismo estiveram associados à inflamação mais extensa. Verificaram ainda que a presença de *C. albicans*, bem como a coabitação de diferentes espécies de *Candida*, foram mais frequentes em pacientes com estomatite sob prótese [41].

Sanità et al. compararam a prevalência de *Candida* spp., em portadores e não portadores de *diabetes mellitus*, com e sem estomatite sob prótese. *Candida albicans* foi a espécie predominante isolada (81,9%), com *C. tropicalis* e *C. glabrata*

demonstrando prevalência semelhante (15,71% e 15,24%, respectivamente). A prevalência de *C. albicans* e *C. tropicalis* nos grupos com estomatite sob prótese foi significativamente mais elevada do que no grupo controle. A prevalência de *C. tropicalis* significativamente aumentou com o maior grau de inflamação, indicando um papel importante desta espécie na progressão da doença [56].

Kilic et al. avaliaram a prevalência de estomatite sob prótese em usuários de *overdentures*. Esta foi diagnosticada em todos pacientes que possuíam próteses com sistema de retenção com barras e em cerca de 71% dos usuários do sistema *locator*. A espécie mais encontrada foi *C. albicans* [32].

No estudo de Nayak et al., que avaliou a presença de *Candida* na cavidade oral de usuários de próteses totais em comparação a não usuários, a colonização foi maior em usuários de próteses, especialmente entre as mulheres. Nelas a espécie *C. glabrata* foi a mais prevalente, enquanto que nos homens, *C. albicans* foi a espécie mais encontrada [46].

Higiene oral e antifúngicos tópicos são normalmente adequados para o tratamento da candidose oral [5, 20, 21]. A remoção diária do biofilme presente nas próteses totais é de suma importância para minimizar a estomatite sob prótese, além de contribuir para o estado de saúde geral do paciente [57]. Para reduzir as frequentes recidivas [40, 44], a troca periódica das próteses também é recomendada.

Para o tratamento associado de higiene oral e antifúngicos tópicos é necessário que o usuário de próteses totais tome alguns cuidados: higienizar dentes remanescentes, cavidade bucal, língua e próteses diariamente. As próteses devem ser limpas e desinfetadas diariamente e deixadas de fora da boca durante a noite ou, pelo menos, por seis horas diárias [5]. A desinfecção das próteses com soluções de limpeza, como a clorexidina ou o hipoclorito de sódio, potencializam a eliminação de *Candida* pela escovação. Isto porque as próteses totais têm superfícies irregulares e porosas nas quais *Candida* adere-se facilmente [5, 58].

Quando indicado o uso de adesivos, os mesmos devem ser removidos tanto da prótese quanto da cavidade oral diariamente. Pacientes de próteses totais devem ser avaliados anualmente por um cirurgião dentista a fim de se verificar a adaptação e a função da prótese, bem como o estado da saúde bucal [57].

Ao enxaguar a boca com o antifúngico tópico, as próteses devem ser removidas para permitir o contato entre a mucosa e o antifúngico [5]. O paciente

deve garantir que a mucosa toda entre em contato com o antifúngico e que este seja mantido na boca por alguns minutos. Após a desinfecção, as próteses devem ser secas ao ar, pois este ato também contribui para a eliminação de *Candida* aderente [58].

A terapia antifúngica tópica é o tratamento de primeira escolha recomendado para a candidose oral sem complicações sistêmicas [5, 6, 20, 35]. Quando a candidose não é controlada com agentes tópicos e mudanças nos hábitos de higiene bucal, o tratamento deve incluir medicamentos sistêmicos [6], principalmente em grupos de alto risco (como portadores de diabetes *mellitus* e imunocomprometidos) [3]. O prognóstico do tratamento com antifúngicos é eficaz na grande maioria dos casos [5].

No início do século 20, o tratamento era feito com violeta de genciana, mas devido ao desenvolvimento de resistência e dos efeitos colaterais foi substituído por um antibiótico polieno, a Nistatina e pela Anfotericina B, ambas descobertas na década de 50 [5-7]. Eles agem através da ligação aos esteróis na membrana celular de fungos, alteram a permeabilidade da membrana celular, sendo drogas bastante recomendadas para o tratamento da candidose bucal [39, 59].

A Nistatina e a Anfotericina B não são absorvidas a partir do trato gastrointestinal e são usados por uso tópico na cavidade oral. O Miconazol, um imidazol, também pode ser usado topicamente, mas seu uso desta forma é limitado pelos potenciais efeitos colaterais, como vômitos e diarreia [5], sendo administrado por via intravenosa para tratamento de infecções sistêmicas [59]. Também é utilizado sistemicamente, o Fluconazol, um triazol, que produz efeitos adversos mínimos, além de ser altamente eficaz na gestão de candidoses em pacientes imunocomprometidos [7, 10].

A Nistatina é o agente tópico mais utilizado para o tratamento de candidose bucal [6]. Ela está disponível como suspensão oral e pastilhas. Deve ser usada como um enxaguatório quatro vezes ao dia por duas semanas [5, 6, 59]. Sendo também muito comum sua administração via oral, na tentativa de amenizar as infecções orofaríngeas. Quando utilizada em grandes doses orais (excedendo cinco milhões de unidades diárias) pode causar diarreia, distúrbios gastrintestinais, náuseas e vômitos [5, 59], sintomas importantes para pacientes que recebem quimioterapia ou imunossupressão [6].

É também aceito que o Gluconato de Clorexidina seja um adequado complemento ou uma alternativa para o tratamento com antifúngicos. Porém, há relato na literatura de que combinação deste com nistatina não se mostrou eficaz *in vitro* contra *Candida albicans*. A razão mais provável é que a interação destes fármacos forma um sal de Clorexidina-Nistatina com baixa solubilidade, tornando assim o fármaco combinado ineficaz como um agente antibiótico. Esta descoberta implica que Nistatina e o Digluconato de Clorexidina podem ser inibidores antagonistas do crescimento de *C. albicans* [39, 42].

O tratamento da estomatite sob prótese pode ser realizado com base nesses recursos clínicos, mas a cultura e o teste de sensibilidade devem ser realizados quando a terapia inicial não apresentar resultado efetivo [516, 22, 23].

Da Costa et al. avaliaram diversos tipos de candidoses orais. Dentre as diversas manifestações clínicas desta doença, a mais prevalente foi a estomatite sob prótese. Ao avaliarem a resistência a antifúngicos encontraram que *C. tropicalis* foi mais resistente a Anfotericina B, Fluconazol e Itraconazol, do que *C. albicans* [60].

A prescrição generalizada de antifúngicos não só leva a um aumento de patógenos resistentes a estes medicamentos, mas também pode ser associada ao comprometimento da microbiota protetora levando a predisposição às infecções [23, 61]. Assim, o controle de infecções através de uma abordagem alternativa [40, 62] é urgentemente necessário, e a terapia utilizando bactérias não patogênicas da microbiota natural, seja ela de prevenção ou de tratamento, representa uma promissora alternativa [29, 34].

Há também a preocupação com as espécies *Candida* não-*albicans*. A resistência de algumas dessas espécies a antifúngicos representa um grande desafio para o tratamento de infecções severas, principalmente as chamadas infecções hospitalares [16, 23, 63, 64]. O estudo nacional de candidemia, uso de antifúngicos e resistência às drogas antifúngicas da Islândia (2012) apontou que a *C. albicans* continua a ser a espécie mais comum de *Candida* isolada de sangue, porém esta espécie é atualmente responsável por apenas 50% dos casos de candidemia [65]. Algumas espécies, como *C. krusei*, *C. lusitaniae* e *C. glabrata*, são resistentes a dois ou três agentes antifúngicos e isto pode limitar severamente as opções terapêuticas [16, 60, 63, 66]. Portanto, o desenvolvimento de terapias alternativas aos antifúngicos é de extrema importância nestes casos [33, 63, 67].

2.2 *Candida* – PATOGENIA

Candida conseguem metabolizar a glicose tanto em condições aeróbias como em anaeróbias. Seu crescimento é influenciado pela temperatura e pelas fontes de carbono presentes no ambiente [5].

Elas podem ser encontradas no corpo humano, sendo os locais mais comuns o trato gastrointestinal, a vagina e a pele. *C. albicans* é a mais comum das espécies isoladas a partir desses locais [5].

Vários estudos têm demonstrado que a patogênese da infecção por *Candida* está associada a fatores específicos, como a capacidade de transformação morfogênica, ou seja, alterar sua forma de levedura a hifa [70], a sua capacidade de persistência dentro das células epiteliais, produção de endotoxinas [3, 68], e proteinases [69, 71]. A adesão de *Candida* às paredes das células epiteliais é um passo importante na iniciação de infecção, sendo promovida por alguns componentes da parede celular dos fungos [72].

O estudo de Budtz-Jorgensen e Stenderup comparou usuários de prótese total com e sem estomatite sob prótese. Em ambos os grupos foram encontradas leveduras, principalmente *C. albicans*. Entretanto, um maior acúmulo de hifas estava presente em 77% dos pacientes com prótese e estomatite [48].

Abaci estudou a relação entre o desenvolvimento de estomatite sob prótese e a produção de fosfolipases por *C. albicans*. As cepas estudadas produziram grandes quantidades de proteinases e fosfolipases, no entanto, não houve diferença na produção de fosfolipase entre o grupos de pacientes com estomatite sob prótese e o grupo controle. Concluiu que há vários fatores de virulência atuando no mecanismo de desenvolvimento da infecção causada pela *C. albicans*. Além disso, ao estudar a genotipagem microbiana destas cepas, verificou que não há uma cepa especificadamente responsável pelo desenvolvimento da infecção [70].

2.3 PROBIÓTICOS

O termo “bactérias ácido lácticas - BAL” é utilizado para descrever um grupo de bactérias Gram positivas, bastonetes e cocos não esporulados, que fermentam carboidratos e formam o ácido láctico como principal produto final. Comuns na natureza, sua distribuição é relacionada a altas concentrações de carboidratos solúveis, produtos de degradação de proteínas, vitaminas e baixa tensão de oxigênio. Em consequência disso, são encontradas no trato intestinal e nas membranas mucosas do homem e dos animais. Também são comuns em leite, produtos lácteos, e em outros alimentos fermentados como carnes, legumes e pães, com o objetivo de manter a conservação biológica destes alimentos. Estes organismos funcionam como antagonistas a outros micro-organismos nos alimentos, já que são capazes de inibir bactérias de origem alimentar por uma variedade de meios, incluindo a produção de ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas [73].

O termo “Probiótico” foi definido pela indústria de alimentos para descrever micro-organismos vivos benéficos à saúde [29, 74] do hospedeiro quando administrados em quantidades adequadas [75, 76], sendo o termo mais utilizado para se referir as bactérias produtoras de ácido láctico. Assim, estes micro-organismos vivos podem ser utilizados para a fabricação de alimentos funcionais, associados ou não a outros ingredientes alimentares como fibras, prebióticos e bioativos de plantas [77].

Para ser considerado um probiótico eficaz, um micro-organismo deve possuir a capacidade de: aderir às células; excluir ou reduzir a aderência dos patógenos; persistir e se multiplicar no trato gastrointestinal; produzir ácidos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas antagonistas ao crescimento de patógenos; ser seguro, não invasivo, não carcinogênico e não patogênico; coagregar para formar uma microbiota equilibrada; ter os mesmos tipos de efeitos em diferentes grupos populacionais e ter as características da sua cepa documentadas [29, 77-79].

Hoje com o aumento de patógenos resistentes a antibióticos, considerados ameaças microbianas, o valor da prevenção das infecções é ainda maior. Os probióticos desempenham um papel importante uma vez que auxiliam o corpo

humano a se proteger das infecções, especialmente nas superfícies mucosas e no trato gastrointestinal [29, 80].

A aplicação dos probióticos, sobretudo de linhagens de lactobacilos intestinais (*L. acidophilus*, *L. Casei*, *L. Lactis*, *L. Plantarum*, *L. salivarius*) e enterococos (*Enterococcus faecalis*, *E. faecium*), está incorporada, usualmente, em produtos que visam a melhora do trato gastrointestinal [73]. Assim as ações microbianas que ocorrem no intestino promovem benefícios não só para a saúde do intestino, mas para a saúde humana em geral [77].

Embora os lactobacilos tenham sido considerados como não patogênicos [81], há evidências crescentes de que eles podem agir, ainda que raramente, como oportunistas patógenos [29, 76, 82], seja por seu envolvimento em cárie dentária [83], ou por sua associação com endocardite bacteriana e infecções localizadas, especialmente em neonatos, imunocomprometidos [76], pacientes com diabetes e problemas cardiovasculares [29]. Muitos destes microorganismos têm sido isolados de material clínico em cultura pura e seu potencial como patógenos oportunistas não pode ser contestado [73].

Apesar de a literatura relatar efeitos adversos oriundos da utilização de probióticos, estes eram associados a condições médicas subjacentes, e mesmo nestes casos, a patogênese das infecções oportunistas acabou sendo mal compreendida [84]. Em conclusão, as características dos casos de eventos adversos graves relacionados ao tratamento com probióticos relatados até o momento identificaram os seguintes fatores de risco: (i) estado imunológico comprometido, (ii) função de barreira intestinal comprometida, tal como ocorre em pancreatite aguda grave, e (iii) cateter venoso central. Como esses fatores estão envolvidos em doenças críticas, o tratamento com probióticos é contraindicado a pacientes criticamente enfermos [84]. Outra medida de segurança a ser adotada é a correta identificação das cepas probióticas ao nível de espécie, uma vez que essa medida permite uma relação de características relevantes como as condições de crescimento, características metabólicas e informação genômicas destes microorganismos [84]. Por isso, a agência Nacional de Vigilância Sanitária, recomenda o consumo de 10^8 UFC até 10^9 UFC de probióticos na porção diária (www.anvisa.gov.br).

Os benefícios atribuídos à ingestão de micro-organismos probióticos incluem: promoção de resistência evitando a colonização de patógenos [14, 15, 30,

77, 85-87]; melhoria da intolerância à lactose [78, 85, 87, 88]; estimulação do sistema imune [30, 33, 74, 77, 78, 89]; diminuição do risco de câncer de cólon [78, 85, 86]; diminuição do risco de doença cardiovascular e dos níveis de colesterol sérico [78, 85]; prevenção de diarreia e alívio da constipação [76, 78, 86]; tratamento e profilaxia de candidoses e infecções do trato urinário [18, 19, 27, 28, 31, 33, 80, 90-92].

Embora exista uma forte evidência [78, 85, 86, 88] para indicar que lactobacilos podem conferir benefícios de saúde intestinal, ainda há muito a ser pesquisado para determinar quais os mecanismos de ação que agem na prevenção e tratamento das doenças [29, 93].

Gordin e Gorbach, diante do vasto uso clínico dos probióticos, examinaram a literatura quanto às aplicações e consistência dos resultados. Encontraram o uso preventivo de probióticos em infecções respiratórias, cárie dentária, e inflamações intestinais. Uso terapêutico em má digestão de lactose, gastroenterite e diversos tipos de diarreia. Segundo estes autores, os probióticos com o maior número de benefícios comprovados na literatura são *Lactobacillus rhamnosus* GG e *Saccharomyces boulardii* [88].

Iwamoto et al. utilizaram-se da administração oral de lactobacilos probióticos para o tratamento de halitose fisiológica e também encontraram efeitos benéficos sobre sangramento à sondagem da bolsa periodontal [94].

Nos últimos anos bactérias probióticas têm sido utilizadas para promover a saúde oral. Esta utilização foi associada a uma melhora na saúde oral, reduzindo o número de patógenos cariogênicos e periodontais, diminuindo o volume do fluido gengival e a concentração de citocinas neste fluido [95].

2.4 PROBIÓTICOS E CANDIDA

Existe uma grande evidência que apoia a utilização das bactérias probióticas na profilaxia e tratamento das candidoses [2,12-15, 18, 19, 24-31].

A microbiota bacteriana possui um importante papel probiótico na profilaxia das candidoses limitando o crescimento de *Candida* nas superfícies cutaneomucosas [31]. Contudo, ainda se conhece pouco sobre o mecanismo de ação que faz com que haja a inibição do crescimento de *Candida* e posterior candidose [19, 24, 29, 34]. Há muitas comprovações *in vitro* da inibição do crescimento de *Candida* e da diminuição de sua aderência ao epitélio vaginal por lactobacilos, e consequente, prevenção da candidose vulvovaginal, porém há uma carência de estudos clínicos para comprovar estas descobertas [13, 19, 29, 31, 70].

Young et al. consideraram a coexistência de *Lactobacillus acidophilus* e *Candida* na boca saudável, a fim de determinar os efeitos que um poderia exercer sobre o outro na microbiota, e se uma alteração desta relação poderia envolver o aumento das candidoses bucais. Os resultados obtidos sugerem um equilíbrio entre as duas espécies em condições normais [96]. As leveduras serviriam de estimulantes nutricionais aos lactobacilos, que por sua vez, preveniriam o desenvolvimento excessivo de *C. albicans*, através da produção de ácido láctico [96, 97].

Koser et al. estudaram o efeito de *C. albicans* sobre o crescimento de lactobacilos (*L. casei*, *L. plantarum*, *L. fermenti*, *L. acidophilus*) em um meio deficiente em vitaminas para os lactobacilos e satisfatório para as leveduras. *C. albicans* suportou e estimulou o crescimento de todas as cepas de três das quatro espécies de lactobacilos testados, servindo de estimulante nutricional para os mesmos, no entanto, algumas evidências de antagonismo foram observadas: *C. albicans* em associação com lactobacilos não atingiu contagens elevadas como quando cresce no mesmo meio em cultura pura [98].

Elahi et al. avaliaram a duração da colonização por *Candida* na cavidade oral de camundongos inoculados com bactérias probióticas (*L. acidophilus* LAFTI L10). Comprovaram uma diminuição desta colonização por *Candida albicans*, e atribuíram este feito a estimulação da produção de IL-4 e IFN- γ nos gânglios

linfáticos e ao aumento da concentração de óxido nítrico na saliva destes camundongos [30].

Hatakka et al. afirmaram que um queijo elaborado com bactérias probióticas (*L. rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* LC 705, *Propionibacterium freudenreichii* ssp., *Shermanii* JS) pode reduzir a prevalência de candidose oral em idosos. Segundo estes autores, os probióticos podem ser regularmente utilizados sem efeitos colaterais, tanto como meio profiláticos quanto terapêutico às candidoses orais. Além disso, afirmam que estes micro-organismos diminuem o risco de hipossalivação e xerostomia, sendo considerados agentes de benefício da saúde bucal geral [99].

Hasslöf et al. avaliaram a capacidade de uma seleção de lactobacilos vendidos comercialmente (*L. plantarum* 299v, *L. plantarum* 931, *L. rhamnosus* GG ATCC 53103, *L. rhamnosus* LB21, *L. paracasei* F19, *L. reuteri* PTA 5289, *L. reuteri* ATCC 55730, *L. acidophilus* La5) inibir o crescimento de *Streptococcus* do grupo mutans e *C. albicans* em mucosa oral. Todas as oito cepas de lactobacilos testadas reduziram o crescimento *Candida*, mas este efeito foi mais fraco do que para os estreptococos do grupo mutans [100].

Ishikawa testou a eficácia de algumas cepas de probióticos (*L. rhamnosus* HS111, *L. acidophilus* HS101) na redução da prevalência de *Candida* oral em usuários de próteses totais. Os resultados mostraram uma inibição ao crescimento de *Candida* sp., pela associação de *Lactobacillus* probióticos [26].

O estudo de Matsubara et al. avaliou o tratamento contra a colonização por *Candida albicans* em mucosa oral de murinos imunossuprimidos através da utilização de bactérias probióticas (*L. acidophilus* NCFM, e *L. rhamnosus* Lr-32), tendo como controle o tratamento com Nistatina. No grupo tratado com *L. rhamnosus*, a redução da colonização da levedura foi significativamente maior em comparação com a do grupo que recebeu Nistatina [25].

Ishijima et al. estudaram a capacidade de uma bactéria probiótica, *Streptococcus salivarius* K12, modular o crescimento de *C. albicans* *in vitro* e sua atividade terapêutica num modelo animal de candidose oral. No estudo *in vitro*, houve inibição a adesão das leveduras à placa de petri de maneira dose dependente. O estudo intuiu que o *S. salivarius* K12 não era diretamente fungicida, mas que a inibição da adesão da *Candida* ao substrato se dava por causa da ligação destas bactérias as hifas da levedura. Do tratamento da candidose oral em ratos,

percebeu-se que a presença da bactéria probiótica protegeu os animais de infecções severas. Este estudo sugere que a bactéria probiótica pode inibir o processo de invasão de *C. albicans* em superfícies mucosas ou a sua adesão a resinas acrílicas de próteses [101].

O aumento da incidência das candidoses e sua crescente resistência ao tratamento antifúngico impulsionam os estudos sobre os supostos mecanismos de ação das bactérias probióticas intestinais na profilaxia e no tratamento das candidoses [24-27, 91]. A falta de conhecimento sobre os mecanismos de ação dos probióticos também se torna uma grande dificuldade para se entender a segurança da utilização dos mesmos [84].

Os probióticos são considerados por alguns autores [24, 27, 28, 31, 37, 90, 91, 93, 102, 103] como uma alternativa ou um complemento ao tratamento com antifúngicos e antibióticos. A principal razão é que o corpo humano tem um delicado equilíbrio entre micro-organismos benéficos e potencialmente patogênicos, e devido a algumas condições, especialmente durante o uso de antibióticos, este equilíbrio natural é interrompido, gerando um aumento do número dos agentes patogênicos. Os probióticos podem restabelecer o equilíbrio perdido, competindo com os patógenos por adesão às células epiteliais e nutrientes, modificando o pH ou produzindo substâncias antimicrobianas [102], sendo assim, além da profilaxia, a microbiota intestinal pode também exercer efeitos bioterapêuticos contra a candidose [24, 28, 103].

Entre os mecanismos sugeridos para explicar a atividade anti-*Candida* do probiótico, estão: a competição nutricional, o bloqueio dos receptores de adesinas para *Candida* sp. nas células epiteliais, adesão as células epiteliais gerando competição pelo sítio de adesão [29, 104-107], o aumento do peristaltismo intestinal, o aumento na taxa de renovação das células epiteliais do intestino, alterações de pH [24], produção de bacteriocinas [26, 27, 108-110], moléculas de coagregação [27, 90, 104, 107], ácido láctico [96], ácido acético, peróxido de hidrogênio [27, 49, 100, 106, 107] e biossurfactantes [14, 15, 111, 112] que resultariam na inibição do crescimento do patógeno. No entanto, nem todas essas propriedades podem ser necessárias para impedir um processo infeccioso para cada agente patogênico [93].

Aroutcheva et al. sugeriram que a associação entre ácidos, bacteriocinas e peróxido de hidrogênio, agem sinergicamente para suprimir o crescimento de bactérias patogênicas [113].

Burton et al. estudaram a dose de administração da bacteriocina produzida por *S. salivarius* que, através de bochechos, teria um efeito antimicrobiano reduzindo os níveis de componentes voláteis sulfurosos, e consequentemente diminuiria a halitose. O resultado deste estudo indicou que a substituição de bactérias causadoras de halitose por bactérias competitivas, tais como *S. salivarius* K12 pode fornecer uma estratégia eficaz para reduzir a gravidade da halitose [110].

Embora Altermann et al. [114] tenham comprovado, através de mapeamento genético, que *L. acidophilus* NCFM seja produtor de uma importante bacteriocina, Ishikawa [26] pesquisou *in vitro* a produção de bacteriocinas por *Lactobacillus* spp. como um dos principais mecanismos de ação contra *Candida*. Seus resultados demonstraram que os lactobacilos não produziram bacteriocinas na presença de nenhuma das espécies de *Candida*.

Ishijima estudando um modelo animal de candidose oral, sugeriu que a bactéria probiótica *S. salivarius* K12 pode inibir o processo de invasão de *C. albicans* em superfícies mucosas ou a sua adesão a resinas acrílicas de próteses, por meio de mecanismos de ação não associados à produção de bacteriocinas [101].

Biossurfactantes produzidos por algumas espécies de lactobacilos (*Lactobacillus* sp. CV8LAC, *L. rhamnosus* GR-1, *L. fermentum* RC-14) têm sido estudados por reduzirem a adesão de organismos patogênicos a diversos tipos de próteses instaladas no corpo humano [14, 15, 90, 111, 112, 115], já que neste sentido, a liberação de biossurfactantes por bactérias probióticas *in vivo* pode ser considerada como uma arma de defesa contra outras cepas colonizadoras.

A adesão de biofilme à superfície de silicone das válvulas de fala utilizadas por pacientes traqueostomizados ou laringectomizados é um grande problema, pois obriga a substituição frequente das mesmas. Estudos [14, 15, 112] mostram que a utilização de bactérias probióticas (*Lactobacillus* sp. CV8LAC, *Streptococcus thermophilus* A, *Lactococcus lactis* 53) reduziu *in vitro* a formação do biofilme neste tipo de prótese. Os resultados obtidos mostraram que o biossurfactante, produzido pelos probióticos, foi eficaz diminuindo as taxas de deposição inicial de biofilme bacteriano, bem como o número de células de bactérias aderentes após 4 horas, para todos os micro-organismos testados, incluindo *C. albicans* e *C. tropicalis*. Porém, os biossurfactantes agiram melhor contra a adesão de *C. albicans*, provavelmente devido à diferença de hidrofobicidade entre as espécies [112].

Clinicamente estes resultados sugerem um aumento na vida útil destas próteses de fala [14, 15].

O estudo de Velraeds et al. investigou a inibição da adesão de *E. faecalis* por três cepas de *Lactobacillus*. Descobriram que somente uma cepa dos *Lactobacillus* estudados, *L. casei* subsp. *rharnosus* 36, foi incapaz de inibir a adesão deste patógeno, embora produzisse biossufarctantes. As outras duas cepas, *L. acidophilus* RC14 e *L. fermentum* B54 produziram os biossurfactantes e retardaram a adesão inicial deste agente patogênico. Isto indica que embora as três cepas produzam biossurfactantes, a ação dos mesmos sobre um patógeno específico foi diferente. Assim, não se deve esperar que os produtos de diferentes cepas de *Lactobacillus* produzam resultados equivalentes para qualquer dado patógeno [116].

2.4.1 Mecanismos de ação

2.4.1.1 Peróxido de hidrogênio

As BAL são amplamente conhecidas pela atividade antibacteriana por meio da produção de peróxido de hidrogênio [49, 100]. Diversos autores têm estudado métodos de medir a produção do H_2O_2 . Utilizaram-se de métodos qualitativos [117], quantitativos [118, 119] e semi-quantitativos [27].

O método de Eschenbach [120], que demonstra qualitativamente a produção de peróxido de hidrogênio, já consagrado na literatura, tem sido criticado pois o meio utilizado por ele (Tetrametilbenzidina - TMB) não permite o crescimento de qualquer lactobacilo [117].

Desta forma, a busca de novas metodologias para a detecção da produção de peróxido de hidrogênio tem sido desenvolvida. Wilks [121] desenvolveu um método semi-quantitativo para esta detecção. Este método também foi utilizado por Martinez [27, 122]. Este estudo e o de Strus [122] analisaram isolados *Lactobacillus* sp. provenientes de amostras vaginais de pacientes diagnosticadas com candidose

vulvovaginal. Embora o estudo de Martinez tenha obtido 97,4% dos isolados como produtores de peróxido de hidrogênio, ambos os estudos sugerem que somente o peróxido de hidrogênio não protege contra infecções fúngicas, sendo a produção de H_2O_2 apenas um dos mecanismos que regem a atividade antifúngica dos *Lactobacillus*.

Apesar disso, é indiscutível a importância do H_2O_2 produzido pelas espécies de lactobacilos na manutenção de uma microbiota vaginal saudável, já que esta substância é letal a diversos micro-organismos patogênicos [18, 49, 100, 106, 113].

2.4.1.2 Ácidos Orgânicos

A produção de ácidos orgânicos, como o ácido láctico, por lactobacilos mantém o pH vaginal inferior a 4,5 criando um ambiente inóspito para o desenvolvimento da maior parte dos patógenos vaginais [18, 106].

O estudo feito por Young et al. demonstrou, nas curvas de crescimento típicas de leveduras e lactobacilos cultivados juntos e separadamente, que houve uma diminuição no número de leveduras e um aumento de lactobacilos, quando crescidos em cultura mista. Notou-se que, após 24 horas de incubação, as culturas puras de lactobacilos eram mais fortemente ácidas (pH 3,7-4,2) do que as culturas puras de leveduras (pH 5,3-5,8). Isto sugeriu aos autores a possibilidade de que a diminuição de *C. albicans* em culturas mistas pode ser devido à acumulação de ácido láctico. Assim, acrescentaram ácido láctico em vez dos lactobacilos às culturas de *Candida*, até alcançar o pH obtido nas culturas mistas. Concluíram que a presença do ácido láctico, nas quantidades utilizadas, produziu uma diminuição acentuada em *C. albicans* [96].

Köhler et al. investigaram o uso de dois lactobacilos, *L. rhamnosus* e *L. reuteri*, para redução na incidência de candidose vulvovaginal. As experiências *in vitro* demonstraram que o ácido láctico a um pH baixo tem um importante papel supressor no crescimento das leveduras [13].

2.4.1.3 Capacidade de Coagregação

O termo coagregação é utilizado para designar a agregação de diferentes linhagens de micro-organismos [27, 104].

Em lactobacilos os mecanismos de coagregação bloqueia a propagação dos agentes patogênicos [90], resultando num aumento da concentração de substâncias inibitórias, produzidas por bactérias do gênero *Lactobacillus*, ao redor do patógeno [107]. Além disso, a capacidade de coagregação faz com que os lactobacilos bloqueiem a ligação de potenciais agentes patogênicos ao epitélio, especialmente *C. albicans* [104].

Outros estudos que observaram co-culturas de *Candida* e *Lactobacillus* perceberam a formação de colônias mistas, mostrando a capacidade dos lactobacilos aderirem às células de *Candida* [96, 104].

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os possíveis mecanismos de ação dos probióticos pelos quais esses micro-organismos impedem o crescimento de *Candida* sp.

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Testar *in vitro* os mecanismos de coagregação, produção de peróxido de hidrogênio e ácidos orgânicos.

3.3 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

Avaliar as curvas de crescimento típicas de leveduras e lactobacilos cultivados juntos e separadamente, e observar as alterações de pH destas culturas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS

Foram estudadas 77 amostras de leveduras. Estas leveduras foram isoladas de palato de pacientes da Faculdade de Odontologia USP, usuários de próteses totais, durante os anos de 2012 e 2013, através do projeto de pesquisa intitulado “Utilização de probióticos adicionados em queijo minas frescal para controle da prevalência de Candidose oral – estudo duplo-cego randomizado” da pesquisadora Tatiana Yuriko Miyazima, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, sob o registro FR 331277, protocolo 55/10. Também foram utilizadas 4 cepas certificadas ATCC de *C. albicans* 10231, *C. albicans* 90028, *C. glabrata* 15126 e *C. krusei* 6258. ATCC é um centro de recursos biológicos e uma organização de pesquisa independente, privada, sem fins lucrativos que autentica micro-organismos e linhas de células e gere logística de preservação a longo prazo e distribuição das culturas para a comunidade científica (www.atcc.org).

Os lactobacilos estudados foram em número de 3 cepas de 2 espécies: *L. acidophilus* NCFM e *L. rhamnosus* Lr-32 e HN001- Howaru® Premium Probiotics, da Danisco (Danisco Brasil Ltda., Brasil). Para os testes de inibição e produção de peróxido de hidrogênio, cada amostra de levedura foi cultivada com cada cepa de lactobacilo, havendo, portanto, 81 amostras a serem testadas. Nos outros testes, foram utilizadas as ATCC *C. albicans* 10231, *C. albicans* 90028, *C. glabrata* 15126 e *C. krusei* 6258 e três amostras dos isolados de cavidade oral, duas amostras de *C. albicans*, as quais denominamos A42 e A53 (amostra 42 e amostra 53) para facilitar o entendimento, e uma de *C. dubliniensis*, a qual denominamos A47(amostra 47).

Estas amostras foram escolhidas, pois *C. albicans* foi a espécie que obteve maior capacidade de ser inibida no teste de inibição, *C. dubliniensis* por ter sido a segunda espécie com maior capacidade de ser inibida neste teste e *C. glabrata* 15126 e *C. krusei* 6258, por não terem sido inibidas por nenhum lactobacilo no teste de inibição, servindo como controle para os nossos testes.

4.2 TESTES

4.2.1 Teste de inibição de *Candida* por probióticos

Este teste seguiu a metodologia descrita por de Fitzsimmons e Berry [123] modificada por Ishikawa [26]. Foram preparadas, por infusão (Figura 4.1), placas contendo meio de ágar MRS *Lactobacilli* (de Man, Rogosa & Sharpe-Difco, Detroit, EUA) e o inóculo de lactobacilos (*L. acidophilus* NCFM, *L. rhamnosus* Lr-32 e *L. rhamnosus* HN001- Howaru[®]). Estas foram incubadas a 37°C por 24 horas, em condições aeróbicas. Após o crescimento das bactérias, o meio foi cortado na região central, medindo 2 cm e transferido a outra placa estéril (Figura 4.2).

Figura 4.1- Placas preparadas com o inóculo de *Lactobacillus* em meio de ágar MRS *Lactobacilli*

Figura 4.2 – Corte de 2 cm no meio inoculado após incubação por 24h a 37°C em aerobiose

Suas laterais foram preenchidas com meio fundido a 47°C de ágar Sabouraud dextrose (ASD- Difco, Detroit, EUA), com o auxílio de uma pipeta até nivelar com o meio já solidificado de MRS contendo lactobacilo (Figura 4.3). Após a solidificação do ASD, as placas foram utilizadas neste teste (Figura 4.4).

Figura 4.3- Preenchimento das placas com meio fundido de ASD

Figura 4.4 – Placas após a solidificação do ASD nivelado ao MRS inoculado com lactobacilo

Foi preparado o inóculo de cada levedura em concentração de 0,5 da escala de MacFarland. Este foi semeado sobre o meio (Figura 4.5), em duplicata, com o auxílio de um *swab* de algodão (Absorve[®], Jiangsu, China), depois, as placas foram préincubadas a 4°C por 4 horas e incubadas a 37°C por 48 horas em condições aeróbicas.

Figura 4.5 – Semeadura em superfície, com auxílio de swab de algodão para a realização do teste de inibição por probióticos

Os resultados foram avaliados visualmente de acordo com a inibição do crescimento da levedura sobre a faixa de 2 cm de probióticos, segundo Strus et al. [122], sendo interpretados como nenhuma inibição, inibição parcial ou total (Figura 4.6).

Figura 4.6- Resultados do teste de inibição: inibição total, inibição parcial e nenhuma inibição

4.2.2 Teste de produção de peróxido de hidrogênio

As amostras foram testadas semi-quantitativamente para a produção de H_2O_2 conforme o método desenvolvido por WILKS et al.[121], e aprimorado por Martinez [27].

A primeira parte do teste consiste em avaliar a produção de peróxido de hidrogênio pelos lactobacilos testados. Desta forma, placas de petri com o meio MRS (Difco, Detroit, EUA) e seus inóculos foram incubadas a 37°C durante 24 horas, em condições aeróbicas. Após, este período, o meio e a cultura de lactobacilo de cada placa obtida foi colocada em contato com uma tira específica (Figuras 4.7) impregnada com peroxidase (Merckoquant Peroxide Test; Merck, Darmstadt, Alemanha). Neste teste, a enzima transfere o peróxido de hidrogênio para um indicador redox orgânico, gerando um produto de oxidação azul, cuja intensidade pode ser avaliada visualmente e comparada com a escala fornecida pelo fabricante. Desta maneira, a produção da substância pelos isolados testados foi expressa observando-se os seguintes intervalos: negativo (0), 1-3, 3-10, 10-30, 30-100 mg/l de H_2O_2 [27, 121] (Figura 4.8).

Figura 4.7- Tira específica impregnada com peroxidase (Merckoquant Peroxide Test; Merck, Darmstadt, Alemanha)

Figura 4.8 – Escala para medição de peróxido de hidrogênio com tira impregnada com peroxidase

Esta parte do teste permite avaliar se os lactobacilos utilizados neste estudo são produtores de peróxido de hidrogênio em suas culturas puras.

Para a segunda parte do teste, foram testadas as amostras com resultado de inibição total no teste de inibição por probióticos (item 4.2.1). As placas de petri com os meios MRS (Difco, Detroit, EUA) e ASD (Difco, Detroit, EUA), e seus inóculos foram incubadas a 37°C durante 48 horas. Havendo inibição total do crescimento da levedura sobre a faixa de lactobacilo, o meio de lactobacilo foi colocado em contato com a tira específica impregnada com peroxidase (Merckoquant Peroxide Test; Merck, Darmstadt, Alemanha), e a leitura foi feita como já citado acima (Figura 4.9).

Figura 4.9 – Leituras do teste de produção de peróxido de hidrogênio, com auxílio de tira impregnada por peroxidase

Esta segunda parte do teste permite a avaliação da produção de peróxido de hidrogênio por *Lactobacillus* de diferentes cepas, em contato com diferentes espécies de *Candida*.

Todas as leituras foram feitas em duplicata.

4.2.3 Teste de coagregação

Lactobacillus foram testados quanto à sua capacidade de coagregarem com os patógenos do gênero *Candida*. Para isso foi utilizado o método descrito por Reid et al. [124], com algumas modificações feitas por Mastromarino et al. [107] e por Gil et al. [92].

Placas de cultura de 24 poços contendo lamínulas de vidro redondas foram adicionadas de (Figura 4.10): i) 500 μ l da cultura de *Lactobacillus* sp. cultivada em caldo de MRS (Difco, Detroit, EUA) – $DO_{495nm} = 1\text{Å}$ (aproximadamente 10^6 UFC/ml) - e incubada a 37°C durante 24 horas e ii) 500 μ l de *Candida* sp, incubada a 37°C durante 24 horas em caldo de BHI (Difco, Detroit, EUA) - $DO_{495nm} = 1\text{Å}$ (aproximadamente 10^6 UFC/ml). As placas foram incubadas a 37°C durante 4h num agitador orbital (Ika®,Staufen, Alemanha) a 100 rpm e a coagregação foi determinada por coloração Gram das lamínulas de vidro redondas, através da observação sob microscopia óptica.

Figura 4.10 – Meios inoculados sendo distribuídos em placas de 24 poços com lamínulas redondas para o teste de coagregação

Para avaliar o grau de coagregação foi utilizada a escala descrita por Reid et al. [124], onde 0 significa nenhuma agregação; 1 pequenos agregados com pequenas aglomerados visíveis de bactérias; 2 agregados com maior número de bactérias; 3 grumos macroscopicamente visíveis com grupos maiores de bactérias no centro do poço; 4 aglomerados macroscopicamente visíveis (Figura 4.11).

Figura 4.11 - Microfotografias (magnificação 40X) mostrando a coagregação entre *Lactobacillus* e *Candida* segundo a escala de Reid et al.(1990): (1) *L. acidophilus* NCFM e *C. albicans* (A42); (2) *L. acidophilus* NCFM e *C. dubliniensis* (A47); (3) *L. acidophilus* NCFM e *C. albicans* 10231; (4) *L. rhamnosus* Lr-32 e *C. dubliniensis* (A47)

4.2.4 Ensaios de produção de ácidos orgânicos

A produção de ácidos orgânicos foi quantificada em gramas por litro, por titulação ácido-base, de acordo com Edema e Sanni [125].

Após ajustar a absorvância $DO_{495nm} = 1\text{Å}$ (Figura 4.12), com auxilio de um espectofotômetro (Biospectro, Curitiba, Brasil), das culturas de lactobacilos e *Candida*, preparamos as culturas a serem utilizadas neste teste de forma que os inóculos experimentais obtivessem 10 ml de volume final a constar: 2 ml de lactobacilo para 8 ml de MRS (diluição 1:5), para as culturas puras de lactobacilos; e 2 ml de lactobacilo acrescido de 2 ml de *Candida* e 6 ml de MRS, para as culturas co-culturas.

Figura 4.12 – Espectofotômetro utilizado para ajustar a absorvância das culturas a $DO_{495nm} = 1\text{Å}$

Os inóculos incubados a 37°C durante 24h em condições aeróbicas.

Após este período foram centrifugados a 4000 rpm (1800 X g) (Figura 4.13). Ao sobrenadante foi acrescentado o indicador de pH fenolftaleína (Impex, Diadema, Brasil) que altera sua coloração de acordo com a alcalinidade do meio. Este se apresenta na forma incolor em pH menor que 8, rosa em pH entre 8 e 10, e roxa em pH entre 10 e 12 (Figura 4.14). A mistura foi titulada (Figura 4.15) com NaOH 1N (Impex, Diadema, Brasil). O equivalente a produção do ácido é a quantidade de NaOH consumida em ml. Cada ml de NaOH 1N é equivalente para 90,08 mg de ácido láctico (Figura 4.16).

Figura 4.13- Tubos com inóculos foram centrifugados a 4000 rpm (1800 X g)

Figura 4.14 – Alteração da cor do meio acrescido de fenolftaleína de acordo com sua alcalinidade

Figura 4.15 - A mistura sendo titulada com NaOH (1 N)

Figura 4.16 – Esquema da titulação ácido-base

Os resultados foram obtidos dos valores medidos em dois ensaios independentes em triplicata.

4.2.5 Teste de curva de crescimento, medição de pH e quantificação em UFC de *Candida* e *Lactobacillus*

Para estes testes foram utilizadas as amostras de *Candida* selecionadas - *C. albicans* 10231, *C. albicans* 90028, *C. glabrata* 15126, *C. krusei* 6258, *C. albicans* (A42), *C. albicans* (A53) e *C. dubliniensis* (A47) - bem como dos *Lactobacillus* estudados - *L. acidophilus* NCFM, *L. rhamnosus* Lr-32, *L. rhamnosus* HN001-Howaru[®] - e, por fim das co-culturas destes micro-organismos. Este método foi descrito por Young et al. [96].

Cada amostra de micro-organismo foi cultivada em caldo MRS (Difco, Detroit, EUA) em *overnight*. Após este período, a absorbância das culturas foi ajustada a 1Å (DO_{495nm}), com a ajuda de um espectrofotômetro (Biospectro, Curitiba, Brasil). Então 0,5 ml de cada cultura foi acrescentado a 19,5 ml de caldo MRS (diluição 1:40). Distribuíram-se 2 ml de cada cultura em tubos de acordo com o número de leituras a

serem realizadas. Estas amostras foram incubadas a 37°C por 48 horas. Para as culturas puras, realizaram-se diluições seriadas das amostras a 0, 4, 6, 8, 10, 12, 24 e 48 horas. Para as co-culturas, foram misturados 2 ml de cada micro-organismo a sexta hora. Isso porque, os ensaios de culturas puras nos demonstraram que neste período (6 horas) as culturas estavam no meio da fase de crescimento exponencial, antes disso as leveduras estariam na fase “lag” ou latente. A diluição seriada das co-culturas foi realizada a partir deste período.

Das amostras de *Candida*, a partir das diluições seriadas (Figura 4.17), foram semeados, pela técnica de gota, 25µl em triplicata em superfícies de placas contendo ágar Sabouraud dextrose (ASD, Difco, Detroit, EUA) (Figura 4.18) e incubadas por 24h a 37°C em aerobiose. Das amostras de lactobacilos, foram semeados, pela técnica de gota, 25µl em triplicata em superfícies de placas contendo ágar MRS (Difco, Detroit, EUA) seguido de incubação durante 48h a 37°C. Das amostras com ambos os micro-organismos, co-cultura, 25µL foram semeados como descrito anteriormente, em cada um dos meios seletivos para leveduras ou lactobacilos, sendo estes ASD adicionado com cloranfenicol (Difco, Detroit, EUA) e ágar MRS (Difco, Detroit, EUA) adicionado de 200µg/ml de nitrato miconazol (Sigma-aldrich, Saint Louis, EUA) para que pudéssemos fazer a contagem de UFC de cada micro-organismo separadamente após os períodos de incubação (Figuras 4.19 e 4.20).

Figura 4.17 - Esquema das diluições seriadas

Figura 4.18 – Técnica da gota de 25µl para semeadura em ASD.

Figura 4.19- Esquema das sementeiras do teste de crescimento

Figura 4.20-, Contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) por ml de *Candida* após a incubação por 24h

Assim, foi possível verificar se houve diminuição nas leveduras quando crescidas junto aos lactobacilos, e quantificar a redução de acordo com as cepas de *Candida* e de *Lactobacillus*.

Como descrito anteriormente para a contagem de UFC, em cada um dos períodos citados foi medida a absorbância das culturas (Figuras 4.21 e 4.22) através de um espectrofotômetro (Biospectro, Curitiba, Brasil). Com estes dados construímos as curvas de crescimento dos micro-organismos em culturas puras e em co-culturas.

Figura 4.21 – Amostras acondicionadas em cuvetas para a medição da sua absorbância (DO_{495nm}) através do espectrofotômetro.

Figura 4.22 – Detalhe de uma amostra de *L. rhamnosus* Lr-32 e *C. dubliniensis*, identificada como L47, em T=24h e o controle de MRS caldo (M). A absorbância medida neste caso foi $1.042\text{\AA}$ (DO_{495nm}).

Ainda neste teste, a cada leitura foi medido o pH das amostras, com o auxílio de um pHmetro (Hanna instruments, São Paulo, Brasil) (Figura 4.23), assim também

construímos as curvas de pH das culturas. Com isso foi possível avaliar se as culturas que apresentarem uma diminuição na contagem de leveduras também apresentam uma acidificação do pH.

Todos os resultados foram obtidos a partir de dois ensaios independentes.

Figura 4.23- Medição do pH das amostras

4.2.6 Teste de Inibição por ácido láctico

Para verificar a influência do ácido láctico no crescimento das leveduras foi acrescentado ácido láctico (Impex, Diadema, Brasil) às culturas de leveduras até que a mesma tivesse seu pH igualado (Figura 4.24) ao valor das culturas mistas, das leveduras estudadas com *L. rhamnosus* Lr-32, obtidos anteriormente (Tabela 5.10). Foram avaliadas suas curvas de crescimento e contagem de UFC segundo a metodologia descrita por Young et al. [96] e descrita no item anterior.

Figura 4.24 – Ajuste do pH das culturas de *Candida* através do acréscimo de ácido láctico

4.3 ANÁLISE DE DADOS

Uma vez que este trabalho apresenta uma grande variedade de testes, a análise de dados foi detalhada por teste na seção 5. Para tanto foram utilizados os programas SPSS 16.0 e Microsoft Excel 2010, e devido ao tamanho das amostras e/ou da natureza das variáveis foram utilizados testes não paramétricos, e também inferências sobre a amostra e testes de causalidade. Foram aplicados os testes de Wilcoxon, teste f , teste t -student e intervalos de confiança em curva normal. O nível de significância (α) de cada teste e os demais dados estatísticos estão especificados na próxima seção.

5 RESULTADOS

5.1 TESTE DE INIBIÇÃO DE *Candida* POR PROBIÓTICOS

Os resultados deste teste foram obtidos a partir dos 77 amostras de *Candida* isoladas de boca, e das 4 amostras ATCC de *Candida*, totalizando 81 amostras em dois ensaios independentes, ou seja, foram efetuadas 162 leituras para cada lactobacilo estudado. As frequências relativas e absolutas dos possíveis resultados - nenhuma inibição, inibição parcial e total - podem ser vistos na tabela 5.1.

Tabela 5.1 - Distribuição de frequência de nenhuma inibição, inibição parcial e total das espécies de *Candida* pelos lactobacilos testados

		Nenhuma Inibição		Inibição Parcial		Inibição Total	
		Quantidade	%	Quantidade	%	Quantidade	%
<i>L. rhamnosus</i> Lr-32	<i>C.albicans</i>	0	0%	0	0%	39	100%
	<i>C.dubliniensis</i>	0	0%	0	0%	9	100%
	<i>C.famata</i>	1	50%	1	50%	0	0%
	<i>C. glabrata</i>	9	50%	6	33%	3	17%
	<i>C. kefyr</i>	1	100%	0	0%	0	0%
	<i>C. krusei</i>	2	100%	0	0%	0	0%
	<i>C. tropicalis</i>	2	20%	7	70%	1	10%
<i>L. acidophilus</i> NCFM	<i>C.albicans</i>	14	36%	17	44%	8	21%
	<i>C.dubliniensis</i>	4	44%	2	22%	3	33%
	<i>C.famata</i>	2	100%	0	0%	0	0%
	<i>C. glabrata</i>	16	89%	2	11%	0	0%
	<i>C. kefyr</i>	1	100%	0	0%	0	0%

Continua

Tabela 5.1 - Distribuição de frequência de nenhuma inibição, inibição parcial e total das espécies de *Candida* pelos lactobacilos testados

		Nenhuma Inibição		Inibição Parcial		Inibição Total	
		Quantidade	%	Quantidade	%	Quantidade	%
L. <i>ramnosus</i> HN001- Howaru®	<i>C. krusei</i>	2	100%	0	0%	0	0%
	<i>C. tropicalis</i>	10	100%	0	0%	0	0%
	<i>C. albicans</i>	0	0%	3	4%	75	96%
	<i>C. dubliniensis</i>	0	0%	0	0%	18	100%
	<i>C. famata</i>	1	50%	1	50%	0	0%
	<i>C. glabrata</i>	22	61%	8	22%	6	17%
	<i>C. kefyr</i>	2	50%	2	50%	0	0%
	<i>C. krusei</i>	4	100%	0	0%	0	0%
	<i>C. tropicalis</i>	6	30%	10	50%	4	20%

5.1.1 Análise de Dados

Primeiramente foi verificado se houve inibição total, parcial ou ausência de inibição à ação de *Lactobacillus* para cada espécie de *Candida* (Tabela 5.1). Além disso, foi verificado estatisticamente se essa inibição é significativa para o tamanho da amostra experimentada. Se a inibição fosse puramente aleatória, esperava-se que o nível de inibição fosse de 50%, ou seja, em alguns casos se inibe, em outros, não. Quanto mais longe de 50% for esta proporção, para mais ou para menos, seria possível afirmar que houve uma inibição (ou uma falta de inibição) significativa. Através do teste *t-student*, foi verificado que a probabilidade de um *L. rhamnosus* Lr-32 ser eficaz, independentemente do tipo de *Candida*, é de 97,71%. Já *L. acidophilus* NCFM mostrou uma probabilidade de inibição de 1,82%, enquanto o *L. rhamnosus* HN001- Howaru® de 99,65%.

Em seguida conduziu-se o mesmo teste, porém visando determinar a probabilidade de uma *Candida* ser inibida, não importando qual lactobacilo está em ação (Tabela 5.2).

Tabela 5.2 – Probabilidade de *Candida* spp. serem inibidas por qualquer uma das cepas de *Lactobacillus* estudadas, segundo o teste *t-student*

		Probabilidade (p-valor)
<i>Candida albicans</i>	<i>L. rhamnosus</i> Lr-32	
	<i>L. acidophilus</i> NCFM	0,99
	<i>L. rhamnosus</i> HN001-Howaru®	
<i>Candida dubliniensis</i>	<i>L. rhamnosus</i> Lr-32	
	<i>L. acidophilus</i> NCFM	0,99
	<i>L. rhamnosus</i> HN001-Howaru®	
<i>Candida famata</i>	<i>L. rhamnosus</i> Lr-32	
	<i>L. acidophilus</i> NCFM	0,0
	<i>L. rhamnosus</i> HN001-Howaru®	
<i>Candida glabrata</i>	<i>L. rhamnosus</i> Lr-32	
	<i>L. acidophilus</i> NCFM	0,05
	<i>L. rhamnosus</i> HN001-Howaru®	
<i>Candida kefyr</i>	<i>L. rhamnosus</i> Lr-32	
	<i>L. acidophilus</i> NCFM	0,0
	<i>L. rhamnosus</i> HN001-Howaru®	
<i>Candida krusei</i>	<i>L. rhamnosus</i> Lr-32	
	<i>L. acidophilus</i> NCFM	0,0
	<i>L. rhamnosus</i> HN001-Howaru®	

Continua

Tabela 5.2 – Probabilidade de *Candida* spp. serem inibidas por qualquer uma das cepas de *Lactobacillus* estudadas, segundo o teste *t-student*

		Probabilidade (p-valor)
<i>Candida tropicalis</i>	<i>L. rhamnosus</i> Lr-32	0,15
	<i>L. acidophilus</i> NCFM	
	<i>L. rhamnosus</i> HN001-Howaru®	

5.2 TESTE DE PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

Na primeira parte do teste foi avaliada a capacidade dos lactobacilos estudados produzirem peróxido de hidrogênio. Nas culturas puras, foi observado que os três lactobacilos são produtores desta substância, porém em diferentes capacidades (Tabela 5.3).

Tabela 5.3- Produção de Peróxido de Hidrogênio por *Lactobacillus* em culturas puras (mg/l)

<i>L. rhamnosus</i> Lr-32	3-10
<i>L. acidophilus</i> NCFM	1-3
<i>L. rhamnosus</i> HN001- Howaru®	3-10

Na segunda parte, partiu-se das amostras que obtiveram inibição no teste anterior (item 5.1) e observou-se a produção de peróxido de hidrogênio destas amostras (Tabela 5.4).

Tabela 5.4 - Produção de Peróxido de Hidrogênio detectada nas co-culturas (mg/l)

Micro-organismos						
Espécie 1	Espécie 2	0-1	1-3	3-10	10-30	30-100
<i>L. rhamnosus</i> Lr-32	<i>C. albicans</i>	8	29	2		
	<i>C. dubliniensis</i>		9			
	<i>C. glabrata</i>		3			
	<i>C. tropicalis</i>	1	1			
<i>L. acidophilus</i> NCFM	<i>C. albicans</i>	13				
	<i>C. dubliniensis</i>	3				
	<i>C. glabrata</i>	1				
<i>L. rhamnosus</i> HN001-Howaru®	<i>C. albicans</i>	6	30	1		
	<i>C. dubliniensis</i>	2	7			
	<i>C. glabrata</i>		3			
	<i>C. tropicalis</i>		2			

Assim, foi detectada a produção de peróxido, porém em menor quantidade que nas culturas puras para *L. rhamnosus* Lr-32 e *L. rhamnosus* HN001- Howaru®. Além disso, em nenhuma amostra de co-cultura com *L. acidophilus* NCFM foi detectada a produção desta substância.

5.2.1 Análise de Dados

A redução na produção de peróxido de hidrogênio nas co-culturas foi testada a fim de verificar se essa redução é estatisticamente significante quando comparada aos valores obtidos nas culturas puras. Foi utilizado o Teste não paramétrico de Wilcoxon, pois o mesmo leva em conta a magnitude das diferenças da amostra. Ao adotar a hipótese nula de que não exista diferença entre a produção de cultura pura e de co-cultura, obteve-se um *p*-valor de 0,99 para as amostras de *L. rhamnosus* Lr-32 e *L. rhamnosus* HN001- Howaru®. Já para as amostras de *L. acidophilus* NCFM o *p*-valor foi de apenas 0,08. Desta forma ao se atribuir um nível de significância $\alpha \leq 0,05$, a hipótese nula seria rejeitada para *L. rhamnosus* Lr-32 e *L. rhamnosus*

HN001- Howaru®. Ou seja, não houve diferença na produção de peróxido de hidrogênio em cultura pura ou em co-cultura apenas para os *L. acidophilus* NCFM.

5.3 TESTE DE COAGREGAÇÃO

Os resultados quanto à capacidade de coagregação dos micro-organismos estudados foram obtidos de dois ensaios independentes e em duplicata. Apenas um examinador foi o responsável pela classificação. Dos valores obtidos, o valor mais frequente foi o escolhido para representar o grau de coagregação de cada grupo (Tabela 5.5). Para este teste, bem como nos que seguem, foram utilizadas as amostras ATCC de *C. albicans* 10231, *C. albicans* 90028, *C. glabrata* 15126 e *C. krusei* 6258 e três amostras isoladas da cavidade oral, duas amostras de *C. albicans*, (A42 e A53), e uma de *C. dubliniensis* (A47).

Tabela 5.5- Índices de coagregação obtidos com *Lactobacillus* spp. e *Candida* spp. após 4h de incubação a 37°C, de acordo com a classificação proposta por Reid et al. (1990)*

	<i>C. albicans</i> 10231	<i>C. albicans</i> 90028	<i>C. glabrata</i> 15126	<i>C. krusei</i> 6258	<i>C. albicans</i> (A42)	<i>C. dubliniensis</i> (A47)	<i>C. albicans</i> (A53)
<i>L. rhamnosus</i> Lr- 32	3	2	1	1	3	4	3
<i>L. acidophilus</i> NCFM	3	2	1	2	1	1	2
<i>L. rhamnosus</i> HN001- Howaru®	3	3	1	1	3	2	2

* (0) nenhuma agregação; (1) pequenos agregados com pequenas aglomerações visíveis de bactérias; (2) agregados com maior número de bactérias; (3) grumos macroscopicamente visíveis com grupos maiores de bactérias no centro do poço; (4) aglomerados macroscopicamente visíveis.

5.3.1 Análise de Dados

Para a análise estatística deste teste foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson (r) entre os índices de coagregação obtidos por espécie de *Candida* e cepa de *Lactobacillus* e a probabilidade de inibição obtida por eles no teste de inibição (Tabela 5.6). Este coeficiente pode variar de -1 a +1. Um coeficiente $r = 0$ indica que não existe correlação entre as duas variáveis. Já um $r > 0$ indica uma correlação positiva, ou seja, uma variável aumenta quando a outra cresce, sendo que o $r = +1$ indica uma correlação positiva perfeita. Em contrapartida, $r < 0$ indica que as variáveis se correlacionam em direções opostas, e um $r = -1$ indica uma correlação negativa perfeita.

Tabela 5.6- Coeficiente de correlação para Índices de Coagregação e Probabilidade de Inibição entre *Lactobacillus* e *Candida*

	Coagregação	Inibição	Coeficiente de Correlação (r)
<i>L. rhamnosus</i> Lr-32	3	99,85%	0,501
<i>L. acidophilus</i> NCFM	1	0,09%	
<i>L. rhamnosus</i> HN001- Howaru®	1	99,65%	
<i>C. albicans</i>	2	99,99%	0,573
<i>C. glabrata</i>	1	1,01%	
<i>C. krusei</i>	1	16,31%	
<i>C. dubliniensis</i>	1	99,97%	

5.4 ENSAIOS DE PRODUÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS

A partir da metodologia descrita por Edema e Sanni [125], foi promovida a titulação das amostras de culturas puras de *Lactobacillus* e de suas co-culturas com *Candida* spp. A produção de ácidos orgânicos está expressa na tabela 5.7.

Tabela 5.7 - Produção de Ácidos Orgânicos* nas culturas puras de *Lactobacillus* e em suas co-culturas com *Candida* spp.

Micro-organismo	Co- cultura com	Ácidos Orgânicos (g/l)
<i>L. rhamnosus</i> Lr-32	Cultura pura	30,0
	<i>C. albicans</i> 10231	23,3
	<i>C. albicans</i> 90028	22,1
	<i>C. glabrata</i> 15126	18,4
	<i>C. krusei</i> 6258	19,9
	<i>C. albicans</i> (A42)	27,4
	<i>C. dubliniensis</i> (A47)	26,6
	<i>C. albicans</i> (A53)	23,6
<i>L. rhamnosus</i> HN001-Howaru®	Cultura pura	19,9
	<i>C. albicans</i> 10231	19,9
	<i>C. albicans</i> 90028	14,7
	<i>C. glabrata</i> 15126	18,0
	<i>C. krusei</i> 6258	17,3
	<i>C. albicans</i> (A42)	22,9
	<i>C. dubliniensis</i> (A47)	21,0
	<i>C. albicans</i> (A53)	20,6
<i>L. acidophilus</i> NCFM	Cultura pura	23,6
	<i>C. albicans</i> 10231	20,6
	<i>C. albicans</i> 90028	24,4
	<i>C. glabrata</i> 15126	22,1
	<i>C. krusei</i> 6258	21,0
	<i>C. albicans</i> (A42)	22,9
	<i>C. dubliniensis</i> (A47)	22,5
	<i>C. albicans</i> (A53)	24,4

* de acordo com Edema e Sanni (2008)

5.4.1 Análise de Dados

A fim de saber se a produção de ácidos orgânicos pela cultura pura de lactobacilo é diferente da produção das co-culturas com cada uma das espécies de *Candida*, foi aplicada sobre esta população uma análise de inferência sobre a variância ou teste *f*. Para tanto, foi adotado o nível de significância $\alpha \leq 0,05$. Embora numericamente os valores obtidos para as co-culturas quase sempre tenham sido ligeiramente menores dos que a produção obtida para cada um dos lactobacilos, estatisticamente estes valores só foram diferentes para as culturas de *L. rhamnosus* Lr-32 com *C. albicans* 10231, *C. albicans* 90028, *C. glabrata* 15126, *C. krusei* 6258 e *C. albicans* (A53). Ou seja, a presença de *Candida*, na maioria dos casos estudados, não alterou a produção de ácidos orgânicos pelos *Lactobacillus*.

5.5 TESTE DE CURVA DE CRESCIMENTO, MEDIÇÃO DE PH E QUANTIFICAÇÃO EM UFC DE *Candida* E *Lactobacillus*

5.5.1 Quantificação em UFC de *Candida* e *Lactobacillus*

Os dados obtidos em UFC para quantificar os micro-organismos, foram convertidos em logaritmo com base 10 (Log 10) e assumiu-se uma função distribuição de probabilidade log-normal. Os resultados estão expressos graficamente, gráficos 5.1 a 5.3 para as culturas de *Lactobacillus* e gráficos 5.4 a 5.10 para as contagens de *Candida*.

Gráfico 5.1 - Contagem de UFC das populações de *L. rhamnosus* Lr-32 em cultura pura e co-culturas com *Candida* spp.

Gráfico 5.2 - Contagem de UFC das populações de *L. rhamnosus* HN001-Howaru® em cultura pura e co-culturas com *Candida* spp.

Gráfico 5.3 - Contagem de UFC das populações de *L. acidophilus* NCFM em cultura pura e co-culturas com *Candida* spp

Gráfico 5.4 - Contagem de UFC das populações de *C. albicans* 10231 em cultura pura e co-culturas com *Lactobacillus*

Gráfico 5.5 - Contagem de UFC das populações de *C. albicans* 90028 em cultura pura e co-culturas com *Lactobacillus*

Gráfico 5.6 - Contagem de UFC das populações de *C. glabrata* 15126 em cultura pura e co-culturas com *Lactobacillus*

Gráfico 5.7 - Contagem de UFC das populações de *C. krusei* 6258 em cultura pura e co-culturas com *Lactobacillus*

Gráfico 5.8 - Contagem de UFC das populações de *C. albicans* (A42) em cultura pura e co-culturas com *Lactobacillus*

Gráfico 5.9 - Contagem de UFC das populações de *C. dubliniensis* (A47) em cultura pura e co-culturas com *Lactobacillus*.

Gráfico 5.10 - Contagem de UFC das populações de *C. albicans* (A53) em cultura pura e co-culturas com *Lactobacillus*.

5.5.1.1 Análise de Dados

Os dados obtidos demonstram que as culturas de *Lactobacillus* obtiveram seu pico de contagem em t=24h para *L. rhamnosus* Lr-32 (8,8 log UFC/ml) e *L.*

ramnosus HN001- Howaru® (8,1 log UFC/ml), enquanto que para *L. acidophilus* NCFM este pico se deu em t=48h (7,8 log UFC/ml).

Embora tenha havido algumas alterações nas contagens de lactobacilos nas co-culturas, elas em geral permaneceram num padrão de crescimento semelhante. Deve-se destacar que nelas o pico de contagem por vezes se deu antes do que nas culturas puras. Isto pôde ser observado especialmente nas co-culturas de *L. acidophilus* NCFM, que obtiveram seu pico alterado para t=24h.

Nas culturas puras de *Candida*, em geral, o pico de contagem se deu em t=24h ou t=48h. Nas co-culturas os picos aconteceram antes de t=12h, com uma redução significativa das populações em t=24h e t=48h. Estes períodos coincidem com os picos das populações dos lactobacilos nestas culturas.

Embora os gráficos 5.6 e 5.7, que demonstram a contagem de UFC para *C. glabrata* e *C. krusei*, respectivamente, exibirem uma aparente diminuição das populações destes micro-organismos em todas co-culturas, é sabido, pelos testes anteriores, que estas espécies de *Candida* não são inibidas pelos lactobacilos testados. Esta aparente redução destas populações provavelmente se deu pela falta de nutrientes no meio, uma vez que os gráficos 5.1, 5.2 e 5.3, mostram altas contagens de log UFC/ml (entre 7,9 a 8,4) para os lactobacilos destas culturas.

5.5.2 Medição de pH

As aferições de pH das culturas puras e co-culturas ao longo do tempo estão expressas na tabela 5.8.

Tabela 5.8- Variação de pH de culturas puras e co-culturas conforme o tempo

Micro-organismos		leitura							
Espécie 1	Espécie 2	0h	4h	6h	8h	10h	12h	24h	48h
<i>L. rhamnosus</i> Lr-32	Cultura pura	6,8	6,7	6,5	6,2	5,6	5,0	3,8	3,8
	<i>C. albicans</i> 10231			6,7	6,2	6,0	5,3	3,9	4,0
	<i>C. albicans</i> 90028			6,6	6,4	5,8	5,2	3,8	3,8
	<i>C. glabrata</i> 15126			6,0	5,7	5,2	4,9	4,3	4,4
	<i>C. krusei</i> 6258			5,9	5,6	5,1	4,8	3,9	4,0

Continua

Tabela 5.8- Variação de pH de culturas puras e co-culturas conforme o tempo

Micro-organismos		leitura							
Espécie 1	Espécie 2	0h	4h	6h	8h	10h	12h	24h	48h
	<i>C. albicans</i> (A42)			6,2	5,8	5,2	4,8	3,8	3,8
	<i>C. dubliniensis</i> (A47)			6,2	5,8	5,2	4,8	3,8	3,8
	<i>C. albicans</i> (A53)			6,2	5,7	5,2	4,8	3,8	3,8
<i>L. rhamnosus</i> HN001-Howaru®	Cultura pura	6,9	6,8	6,6	6,4	6,0	5,5	3,9	3,9
	<i>C. albicans</i> 10231			5,9	5,7	5,3	5,1	3,9	3,9
	<i>C. albicans</i> 90028			6,0	5,7	5,4	5,2	3,8	3,9
	<i>C. glabrata</i> 15126			6,2	5,9	5,6	5,3	4,4	4,6
	<i>C. krusei</i> 6258			5,6	5,2	4,7	4,4	3,9	4,0
	<i>C. albicans</i> (A42)			6,3	6,0	5,7	5,5	3,9	3,9
	<i>C. dubliniensis</i> (A47)			6,3	6,0	5,8	5,5	3,9	3,8
	<i>C. albicans</i> (A53)			6,3	6,1	5,9	5,5	3,9	3,8
<i>L. acidophilus</i> NCFM	Cultura pura	6,8	6,8	6,8	6,7	6,5	6,1	4,5	4,4
	<i>C. albicans</i> 10231			5,7	5,4	5,0	4,7	4,3	4,3
	<i>C. albicans</i> 90028			5,7	5,4	5,0	4,6	4,2	4,2
	<i>C. glabrata</i> 15126			5,7	5,4	5,0	4,7	4,4	4,4
	<i>C. krusei</i> 6258			5,7	5,4	5,0	4,7	4,2	4,3
	<i>C. albicans</i> (A42)			6,3	6,1	5,7	5,1	4,1	4,0
	<i>C. dubliniensis</i> (A47)			6,3	6,2	6,0	5,6	4,1	4,0
	<i>C. albicans</i> (A53)			6,4	6,1	5,8	5,2	4,2	4,0
<i>C. albicans</i> 10231	Cultura pura	6,9	6,9	6,8	6,8	6,7	6,5	6,0	6,2
<i>C. albicans</i> 90028	Cultura pura	6,9	6,9	6,8	6,8	6,7	6,6	5,3	5,3
<i>C. glabrata</i> 15126	Cultura pura	6,8	6,8	6,4	6,4	6,4	6,4	6,3	6,2
<i>C. krusei</i> 6258	Cultura pura	6,8	6,8	6,7	6,8	6,5	6,5	5,7	5,8
<i>C. albicans</i> (A42)	Cultura pura	6,5	6,4	6,3	6,2	6,1	6,1	6,1	6,1
<i>C. dubliniensis</i> (A47)	Cultura pura	6,5	6,4	6,3	6,2	6,2	6,2	5,5	5,7
<i>C. albicans</i> (A53)	Cultura pura	6,5	6,4	6,3	6,3	6,2	6,2	5,6	5,6

Inicialmente em t=0h as culturas puras de ambos os micro-organismos apresentavam um pH semelhante entre 6,5 e 6,9. Em t=6h, o período inicial de medição das co-culturas, o pH das culturas também era semelhante e variava de 5,7 a 6,8. Porém em t=24h o pH das culturas de *Lactobacillus* passou estar entre 3,8 a 4,5, enquanto as de *Candida* apresentaram-se mais básicas de 5,3 a 6,3. As co-culturas seguiram o padrão de acidificação das culturas de *Lactobacillus* permanecendo entre 3,8 a 4,5. Os gráficos 5.11 a 5.13, representam as curvas de pH de *C.albicans* (A42) com cada um dos *Lactobacillus* estudados. Neles está exemplificado como o pH das co-culturas acompanha o das culturas de *Lactobacillus*. Nota-se que a acidificação se deu a partir de t=10h e que nas co-

culturas de *L. acidophilus* NCFM o pH obtido foi ainda mais ácido do que na sua cultura pura.

Em t=48h estes padrões não foram alterados, permanecendo em intervalos bem próximos aos obtidos em t=24h. Os demais gráficos deste ensaio estão representados do Apêndice A.

Gráfico 5.11 - Alteração do pH das culturas de *L. rhamnosus* Lr-32 e *C. albicans* (A42) longo do tempo

Gráfico 5.12 - Alteração do pH das culturas de *L. rhamnosus* HN001-Howaru® e *C. albicans* (A42) ao longo do tempo

Gráfico 5.13 - Alteração do pH das culturas de *L. acidophilus* CFM e *C. albicans* (A42) ao longo do tempo

5.5.2.1 Análise de Dados

Para a análise das alterações de pH entre as culturas ao longo do tempo, utilizou-se a análise ANOVA em números naturais. Este teste analisou a diferença entre as variâncias das medições de pH entre as culturas. Quanto mais perto de 1 o valor encontrado, menor o grau de variação entre os valores de pH, ou seja, as variações entre uma cultura pura e uma co-cultura seriam iguais (H_0). Quanto mais diferentes forem os valores de pH destas culturas, mais longe de 1 será o valor encontrado (H_a). Foi adotado o nível de significância $\alpha \leq 0,05$ para testar estas hipóteses.

Assim, ao observar as co-culturas comparadas com as culturas puras de seus respectivos lactobacilos, não houve diferença estatisticamente significativa em um intervalo de confiança de 95% para nenhum dos lactobacilos, ou seja, a acidificação do meio para as culturas puras de lactobacilos e suas co-culturas foi semelhante.

Já ao observar as co-culturas em comparação com as respectivas culturas puras de *Candida*, a grande maioria das culturas testadas apresentou-se estatisticamente diferente da sua cultura controle. Somente a comparação das co-culturas de *C. albicans* 10231 com *L. acidophilus* NCFM, *C. albicans* 90028 e *C. krusei* 6258 com os 3 lactobacilos testados não demonstraram diferenças estatisticamente significantes no intervalo de confiança de 95% quanto a acidificação das co-culturas comparadas as culturas puras.

5.5.3 Curva de Crescimento

A tabela 5.9 expõe os resultados das medições da absorbância (DO_{495nm}) das culturas ao longo do tempo.

Tabela 5.9 - variação de Absorbância ($\text{\AA}$)* de culturas puras e co-culturas conforme o tempo

Micro-organismos		Leitura							
Espécie 1	Espécie 2	0h	4h	6h	8h	10h	12h	24h	48h
<i>L. rhamnosus</i> Lr-32	Cultura pura	0,053	0,149	0,265	0,508	1,037	1,314	1,876	1,833
	<i>C. albicans</i> 10231			0,178	0,405	0,868	1,260	1,858	1,898
	<i>C. albicans</i> 90028			0,216	0,390	0,930	1,318	1,879	1,917
	<i>C. glabrata</i> 15126			0,773	1,104	1,477	1,584	1,783	1,814
	<i>C. krusei</i> 6258			0,718	0,968	1,302	1,488	1,841	1,910
	<i>C. albicans</i> (A42)			0,274	0,752	1,154	1,474	1,702	1,919
	<i>C. dubliniensis</i> (A47)			0,227	0,670	1,121	1,408	1,686	1,912
	<i>C. albicans</i> (A53)			0,240	0,712	1,145	1,446	1,697	1,915
<i>L. rhamnosus</i> HN001- Howaru®	Cultura pura	0,030	0,103	0,191	0,334	0,614	0,893	1,915	1,929
	<i>C. albicans</i> 10231			0,650	0,866	1,111	1,262	1,868	1,910
	<i>C. albicans</i> 90028			0,629	0,844	1,057	1,225	1,879	1,918
	<i>C. glabrata</i> 15126			0,471	1,008	1,168	1,471	1,756	1,756
	<i>C. krusei</i> 6258			0,869	1,179	1,484	1,619	1,831	1,866

Continua

Tabela 5.9 - variação de Absorbância (Å)* de culturas puras e co-culturas conforme o tempo

Micro-organismos		Leitura							
Espécie 1	Espécie 2	0h	4h	6h	8h	10h	12h	24h	48h
	<i>C. albicans</i> (A42)			0,191	0,467	0,744	0,962	1,715	1,918
	<i>C. dubliniensis</i> (A47)			0,159	0,390	0,599	0,890	1,706	1,909
	<i>C. albicans</i> (A53)			0,154	0,382	0,609	0,914	1,712	1,909
<i>L. acidophilus</i> NCFM	Cultura pura	0,026	0,036	0,050	0,110	0,284	0,548	1,642	1,692
	<i>C. albicans</i> 10231			0,860	1,133	1,391	1,551	1,712	1,745
	<i>C. albicans</i> 90028			0,776	1,101	1,402	1,560	1,717	1,806
	<i>C. glabrata</i> 15126			0,896	1,191	1,435	1,571	1,695	1,751
	<i>C. krusei</i> 6258			0,825	1,139	1,425	1,565	1,733	1,766
	<i>C. albicans</i> (A42)			0,148	0,404	0,816	1,104	1,451	1,603
	<i>C. dubliniensis</i> (A47)			0,116	0,230	0,488	0,732	1,418	1,631
	<i>C. albicans</i> (A53)			0,133	0,362	0,742	1,069	1,440	1,628
<i>C. albicans</i> 10231	Cultura pura	0,024	0,046	0,198	0,409	0,725	0,936	1,540	1,446
<i>C. albicans</i> 90028	Cultura pura	0,025	0,065	0,187	0,368	0,622	0,834	1,680	1,686
<i>C. glabrata</i> 15126	Cultura pura	0,024	0,311	0,993	1,308	1,475	1,543	1,699	1,696
<i>C. krusei</i> 6258	Cultura pura	0,024	0,117	0,351	0,545	0,709	0,866	1,484	1,563
<i>C. albicans</i> (A42)	Cultura pura	0,047	0,156	0,455	0,865	1,128	1,283	1,426	1,462
<i>C. dubliniensis</i> (A47)	Cultura pura	0,051	0,136	0,366	0,623	0,891	0,929	1,446	1,434

Tabela 5.9 - variação de Absorbância (Å)* de culturas puras e co-culturas conforme o tempo

Micro-organismos		Leitura							
Espécie 1	Espécie 2	0h	4h	6h	8h	10h	12h	24h	48h
<i>C. albicans</i> (A53)	Cultura pura	0,062	0,170	0,353	0,632	0,890	1,068	1,492	1,525

*DO_{495nm}

5.5.3.1 Análise de Dados

As culturas de *L. rhamnosus* Lr-32, puras e co-culturas, tiveram seu pico de crescimento em 24h. Nas culturas de *L. rhamnosus* HN001-Howaru® e *L. acidophilus* NCFM, puras e co-culturas, o pico ocorreu em 48h.

As culturas puras de *Candida* em geral tiveram seu pico em 24h.

No gráfico 5.14 pode ser observada a comparação entre as curvas de crescimento das culturas puras e da co-cultura de *L. rhamnosus* Lr-32 e *C. albicans* 90028. Nele observa-se a fase latente ou “lag” da *Candida* ocorrendo até t=4h. Também pode ser observado que a curva da co-cultura praticamente acompanha a da cultura pura de lactobacilo e que em todas as curvas houve uma estabilização entre t=24h e t=48h.

Gráfico 5.14- Curvas de Crescimento das culturas de *L. rhamnosus* Lr-32 e *C. albicans* 90028

Os demais gráficos deste teste se encontram no Apêndice B.

5.6 TESTE DE INIBIÇÃO POR ÁCIDO LÁCTICO

A tabela 5.10 apresenta os valores de pH obtidos no teste de crescimento das co-culturas de *L. rhamnosus* Lr-32 com as amostras de *Candida* testadas. A partir destes dados, calculou-se a média dos valores de pH obtidos em cada leitura. Dessa forma, foram determinados os valores de pH que seriam utilizados para o teste de inibição por ácido láctico. Assim, a cada leitura, o ácido láctico foi acrescentado as culturas de leveduras até que se obtivessem os valores de pH apresentados na tabela 5.10.

Tabela 5.10- Valores de pH obtidos nas culturas de *L. rhamnosus* Lr-32 com as cepas de *Candida* avaliadas no teste de crescimento

Espécie 1	Espécie 2	6h	8h	10h	12h	24h	48h
<i>L. rhamnosus</i> Lr-32	<i>C. albicans</i> 10231	6,72	6,19	5,98	5,34	3,94	3,95
	<i>C. albicans</i> 90028	6,64	6,45	5,76	5,16	3,80	3,85
	<i>C. glabrata</i> 15126	6,03	5,74	5,20	4,88	4,33	4,36
	<i>C. krusei</i> 6258	5,93	5,60	5,06	4,79	3,91	3,96
	<i>C. albicans</i> (A42)	6,24	5,75	5,22	4,77	3,80	3,82
	<i>C. dubliniensis</i> (A47)	6,24	5,78	5,22	4,82	3,83	3,79
	<i>C. albicans</i> (A53)	6,23	5,74	5,24	4,79	3,84	3,80
Média dos valores de pH obtidos nas culturas mistas		6,29	5,89	5,38	4,93	3,92	3,93

5.6.1 Curvas de Crescimento

As curvas de crescimento obtidas das culturas puras de *Candida* e de suas culturas acidificadas conforme a metodologia de Young et al. [96], estão representadas nos gráficos 5.15 a 5.22.

Gráfico 5.15 - Curvas de Crescimento das Culturas de *C. albicans* (A42) no teste de inibição por ácido láctico

Gráfico 5.16 - Curvas de Crescimento das Culturas de *C. dubliniensis* (A47) no teste de inibição por ácido láctico

Gráfico 5.17 - Curvas de Crescimento das Culturas de *C. albicans* (A53) no teste de inibição por ácido láctico

Gráfico 5.18 - Curvas de Crescimento das Culturas de *C. albicans* 10231 no teste de inibição por ácido láctico

Gráfico 5.19- Curvas de Crescimento das Culturas de *C. albicans* 10231 no teste de inibição por ácido láctico

Gráfico 5.20- Curvas de Crescimento das Culturas de *C. albicans* 90028 no teste de inibição por ácido láctico

Gráfico 5.21- Curvas de Crescimento das Culturas de *C. glabrata* 15126 no teste de inibição por ácido láctico

Gráfico 5.22- Curvas de Crescimento das Culturas de *C. krusei* 6258 no teste de inibição por ácido láctico

5.6.1.1 Análise de Dados

Nos gráficos, 5.15 a 5.22, observa-se que com exceção de *C. glabrata* e *C. krusei*, as demais cepas testadas apresentaram menores valores de absorbância na presença de ácido láctico. Em t=24h as diferenças entre os valores de pico seguiram a relação: *C. albicans* 90028 > *C. albicans* (A53) > *C. albicans* 10231 > *C. albicans* (A42) > *C. dubliniensis* (A47) > *C. glabrata* 15126 > *C. krusei* 6258. Esta relação mostra quais cepas seriam mais sensíveis à acidificação do meio.

5.6.2 Contagem de UFC

A contagem de colônias foi feita em UFC, e após a conversão dos dados para logaritmos (Log 10), foram representados graficamente (Gráficos 5.23 a 5.29).

Gráfico 5.23- Contagem de log UFC/ml das culturas de *C. albicans* (A42)

Gráfico 5.24- Contagem de log UFC/ml das culturas de *C. dubliniensis* (A47)

Gráfico 5.25- Contagem de log UFC/ml das culturas de *C. albicans* (A53)

Gráfico 5.26 - Contagem de log UFC/ml das culturas de *C. albicans* 10231

Gráfico 5.27 - Contagem de log UFC/ml das culturas de *C. albicans* 90028

Gráfico 5.28 - Contagem de log UFC/ml das culturas de *C. glabrata* 15126

Gráfico 5.29 - Contagem de log UFC/ml das culturas de *C. krusei* 6258

5.6.2.1 Análise de Dados

Ao se comparar a contagem de log UFC/ml das culturas de *Candida* acrescidas de ácido láctico com as suas culturas puras, percebeu-se que em todas as cepas houve redução no número de colônias. A fim de saber se esta redução foi significativa, foram comparados também os valores de UFC/ml obtidos nas co-culturas de cada cepa de *Candida* e *L. rhamnosus* Lr-32, também representadas nos gráficos 5.23 a 5.29.

Ao nível de significância $\alpha \leq 0,10$ todas as culturas de *C. albicans* mostraram diferença estatisticamente significativa entre a redução ocorrida nas co-culturas em comparação às culturas acidificadas. Nestas culturas a presença de *L. rhamnosus* Lr-32 provocou uma redução maior na contagem de colônias que o ácido láctico. Já nesta comparação em relação a *C. dubliniensis*, *C. glabrata* e *C. krusei*, não foram encontradas diferenças estatísticas entre as contagens.

6 DISCUSSÃO

Neste estudo foram avaliadas 39 amostras de *Candida albicans* (48%), 18 de *Candida glabrata* (22%), 10 de *Candida tropicalis* (12,5%), 9 de *Candida dubliniensis* (11%), 2 de *Candida famata* (2,5%), 2 de *Candida krusei* (2,5%) e 1 de *Candida kefyr* (1,5%). Esta proporção entre as espécies encontradas a partir de isolados de usuários de próteses totais está de acordo com o encontrado na literatura, que aponta *C.albicans* como a espécie mais prevalente [4, 5, 10, 32, 39, 42, 46, 48, 49], seguida por *C. glabrata* [4], *C. tropicalis* [56] e *C. dubliniensis* [54] nos usuários de próteses totais.

Estas prevalências refletidas em nossa amostra faz desse estudo um pequeno retrato da composição microbiológica dos usuários de próteses totais.

Dessa forma, se fossem utilizados os probióticos *L. acidophilus* NCFM, *L. rhamnosus* Lr-32 e HN001- Howaru[®], como terapia alternativa aos antifúngicos, os resultados esperados, ou seja, a probabilidade de sucesso na prevenção ou no tratamento da estomatite, provavelmente seria semelhante à apresentada no teste de inibição por probióticos.

Neste teste 100% das amostras de *C. albicans* foram inibidas pelo *L. rhamnosus* Lr-32. *L. rhamnosus* HN001- Howaru[®] inibiu 96% destas amostras, enquanto que *L. acidophilus* NCFM inibiu 21% das amostras. Das amostras de *C. glabrata* 17% foram inibidas pelas cepas de *L. rhamnosus* e nenhuma amostra foi inibida por *L. acidophilus* NCFM. *L. rhamnosus* Lr-32 inibiu 10% das amostras de *C. tropicalis* e *L. rhamnosus* HN001- Howaru[®] 20% das mesmas. Já *L. acidophilus* NCFM não inibiu *C. tropicalis*. 100% das amostras de *C. dubliniensis* foram inibidas pelas cepas de *L. rhamnosus* enquanto *L. acidophilus* inibiu 33% das amostras desta espécie.

Embora *L. rhamnosus* Lr-32 tenha obtido um grau de inibição maior para *C. albicans*, e esta é a espécie mais prevalente [4, 5, 10, 32, 39, 42, 46, 48, 49], o *L. rhamnosus* HN001- Howaru[®] obteve mais sucesso com *C. tropicalis*, e a inibição de *C. glabrata* foi igual para as duas cepas, isso faz deste lactobacilo uma excelente indicação quando estas espécies de *Candida* conhecidas por sua resistência a

antifúngicos [60, 66] estiverem presentes na infecção. As outras espécies de *Candida* testadas, não foram inibidas por nenhum dos lactobacilos deste estudo, porém como são espécies com menor prevalência, este fato não faz o presente estudo discordar dos estudos de Hatakka et al. [99], Ishikawa [26], Matsubara et al. [25] e Ishijima et al. [101] que apontam o uso dos probióticos como uma promissora terapia alternativa à candidose oral.

O teste de probabilidade de inibição por probióticos independente da espécie de *Candida* buscou simular uma situação clínica, onde, a princípio, o Cirurgião Dentista não sabe quais espécies estão envolvidas na infecção e necessita indicar um tratamento. Com as altas probabilidades de inibição por *L. rhamnosus* Lr-32 e de *L. rhamnosus* HN001- Howaru[®] encontradas neste estudo, eles seriam os mais indicados para a terapia contra *Candida*.

Os resultados do presente estudo foram semelhantes aos estudos de Ishikawa [26] e Matsubara et al.[25], que apontaram a cepa com melhor resultado *L. rhamnosus* Lr-32, embora neste estudo *L. rhamnosus* HN001- Howaru[®] tenha uma probabilidade de inibição um pouco maior, *L. rhamnosus* Lr-32 obteve mais sucesso com as espécies mais prevalentes. Porém as probabilidades de inibição para os mesmos lactobacilos foram diferentes das encontradas por Ishikawa [26]. Neste estudo as probabilidades de inibição por *L. rhamnosus* Lr-32 foi 79,3%, por *L. rhamnosus* HN001- Howaru[®] 48,4% e por *L. acidophilus* NCFM 57,3%. Essa diferença talvez tenha sido devido à disparidade das amostras que apresentaram diferentes espécies de *Candida* e em diferentes proporções, ou seja, embora o tamanho das amostras destes estudos tenham tamanhos semelhantes, o presente estudo avaliou uma maior quantidade de espécies de levedura e continha uma maior quantidade de amostras de *C. albicans* e *C. dubliniensis* que o estudo de Ishikawa [26]. Assim, se fossem utilizados os lactobacilos estudados como terapia alternativa aos antifúngicos, seria esperado um maior índice de sucesso no tratamento com *L. rhamnosus*.

As probabilidades de inibição encontradas ao analisar as amostras de *Candida* spp. independentemente do lactobacilo a que foram expostas, mostram que a inibição é espécie dependente. Enquanto *Candida albicans* e *Candida dubliniensis* apresentaram uma probabilidade de inibição de mais de 99%, outras espécies como *C. glabrata* tiveram uma probabilidade muito reduzida. Esta capacidade de inibição de *C. albicans* também foi observada por Koser et al. [98] e Hasslof et al. [100].

A literatura carece de mais estudos sobre a inibição de *Candida* isoladas da cavidade oral por bactérias probióticas, porém esse estudo concorda com os realizados a partir de isolados vulvovaginais que confirmam a capacidade de inibição das *Candida* sp. por bactérias probióticas [13, 19, 31]. Em contrapartida, Köll et al. [126] que investigaram a capacidade dos lactobacilos intestinais em combater as desordens orais, concluíram que a maioria das cepas estudadas, incluindo *L. rhamnosus*, suprimiu o crescimento de diversos patógenos orais, mas nenhuma foi capaz de inibir *C. albicans*.

O presente estudo, diferente de outros, utilizou-se do fato dos lactobacilos serem anaeróbios facultativos [120, 122, 126], já que não são sensíveis ao oxigênio, e os cultivou sempre em aerobiose. Todas as cepas estudadas cresceram muito bem nesta condição.

A produção de peróxido de hidrogênio por bactérias probióticas tem sido amplamente estudada por métodos qualitativos [117, 120] e quantitativos [118, 119]. Elegueu-se o semi- quantitativo desenvolvido por Wilks [121] e também utilizado por Martinez [27]. Estes estudos avaliaram amostras provenientes de pacientes com candidose vulvovaginal. Assim ao avaliarem as culturas de *L. acidophilus* obtiveram respectivamente a produção de 1-3 g/l e 30-100 g/l. Martinez [27] também obteve o resultado de 30-100 g/l para *L. rhamnosus*. Neste estudo os resultados para *L. acidophilus* NCFM coincidiram com os encontrados por Wilks [121], porém foram bem inferiores aos encontrados por Martinez [27].

O presente estudo testou a produção de peróxido de hidrogênio por bactérias probiótica na presença de *Candida*. Os estudos prévios detectaram apenas a produção em culturas puras. Uma vez que esta metodologia só poderia ser aplicada nas amostras que obtiveram sucesso no teste de inibição, o número de amostras experimentadas neste teste foi muito reduzido. Talvez por isso não foi possível detectar estatisticamente a diferença na produção deste composto nas co-culturas de *L. acidophilus* NCFM.

Outro fator limitante deste estudo é que ele não permite avaliar se a medição reduzida da produção do peróxido de hidrogênio nas co-culturas de *L. rhamnosus* ocorreu pelo consumo deste subproduto para que acontecesse a inibição, ou se realmente nessas culturas o valor de produção foi menor.

Uma vez que *L. acidophilus* NCFM foi o menor produtor, mesmo em cultura pura, e ainda assim foi capaz de inibir 16,6% das amostras com qual foi cultivado, o

peróxido de hidrogênio sozinho não pareceu ser o fator mais relevante da inibição. Esses achados concordam com Mastromarino [107], Strus [122], Martinez [27], que embora tenham encontrado uma produção de peróxido de hidrogênio significativa em seus estudos com bactérias probióticas afirmam que este não é o mecanismo de ação diretamente relacionado à atividade antifúngica destes micro-organismos.

Nesse estudo os maiores produtores de H_2O_2 são também os probióticos com melhores resultados no teste de inibição. Ao contrário dos achados de Köhler et al, [13] que mostraram que a espécie que mais inibiu amostras de *Candida* vulvovaginais não foram as que mais produziram H_2O_2 .

Ainda assim, não se pode descartar a importância deste subproduto. Esta substância é reconhecida na literatura por ser a responsável pela manutenção predominante de lactobacilos na microbiota vaginal, mantendo-a saudável [18, 49, 100, 106, 113]

De Andrade et al. estudaram o poder de higienização de tabletes que possuem o peróxido de hidrogênio como mecanismo de ação. Seu estudo *in vivo* demonstrou ineficácia no combate a *Candida* aderente as superfícies de próteses e alegaram que a estrutura do biofilme com outras bactérias seria o responsável por este resultado uma vez que o biofilme protegeria esta levedura da ação dos peróxidos [21].

A capacidade dos lactobacilos e das leveduras estudadas de formarem um biofilme, ou seja, coagregarem, também foi avaliada neste estudo.

Os resultados (*in vitro*) demonstram que existe a capacidade de coagregação entre os micro-organismos estudados. Em geral, os índices de coagregação encontrados para todas as amostras de *C. albicans* e *C. dubliniensis* foram maiores que para as amostras de *C. glabrata* e *C. krusei*, independente do lactobacilo que estava presente na co-cultura. Estas amostras também foram as mais inibidas do teste de inibição. Pensando nisso buscou-se a correlação estatística deste fato. Foram obtidos os índices de correlação $r=0,5$ tanto para a probabilidade de *Candida* ser inibida e seus índices de coagregação tanto como para a probabilidade de cada lactobacilo causar a inibição e seus índices de coagregação. A partir destes achados, este estudo concorda com o trabalho de Mastromarino et al. [107] que afirmou que a capacidade de coagregação só depende da cepa do lactobacilo e do patógeno envolvido, e que este teste daria uma mensuração da interação entre os micro-organismos.

Sendo assim, este estudo revelou que a coagregação contribui para o processo de inibição de *Candida* por bactérias probióticas, embora haja evidências de que a capacidade de coagregação não seja o principal mecanismo de ação, ela de fato contribui para o controle da patogenia, especialmente no que diz respeito a prevenção, impedindo o acesso dos patógenos aos receptores teciduais e interferindo na adesão dos mesmos às mucosas [104]. Esta adesão foi comprovada pelo estudo de Ishijima et al [101], que detectou a capacidade das bactérias probióticas se ligarem as hifas da levedura impedindo adesão desta ao substrato.

O método descrito por Reid et al. [124], pareceu por vezes subjetivo e dependente do examinador que deve ser devidamente calibrado. Porém outros estudos, que utilizaram a mesma metodologia e avaliaram *L. acidophilus* com *C. albicans* [104, 92], e *C. krusei* [92] obtiveram resultados semelhantes aos deste estudo. Houve divergência apenas nos resultados de *L. acidophilus* e *C. glabrata* que no estudo de Gil et al. [92], obteve um índice de 3, enquanto no presente estudo este índice foi 1.

Apesar dos resultados encontrados, deve-se salientar que muitas vezes os resultados microbiológicos *in vitro* não se concretizam em estudos *in vivo*. Isto porque as interações microbianas *in vivo* são muito mais complexas, e envolvem muitos micro-organismos [21].

Outro subproduto das bactérias probióticas amplamente estudado é o ácido láctico. Sua produção é tão importante que estas bactérias são conhecidas como BAL [73]. Neste estudo foi avaliada a produção de ácidos orgânicos (ácido láctico e acético) pelos lactobacilos. Para tanto, foi utilizada a metodologia descrita por Edema e Sanni [125], que leva em conta a massa molar do ácido láctico para o cálculo desta produção. O presente estudo utilizou-se desta metodologia para que se estabelecesse uma ordem de grandeza para a produção de ácidos orgânicos, mesmo não podendo afirmar que a produção encontrada foi somente de ácido láctico, já que as culturas foram feitas em aerobiose e, nesta condição, os lactobacilos apresentam-se predominantemente heterofermentativos.

Os resultados demonstraram que não houve alterações na produção de ácidos orgânicos por lactobacilos devido à presença de *Candida*, ou seja, a produção de ácido não foi estimulada pela presença do patógeno. Ainda assim, esta produção tem sido considerada responsável para a manutenção de uma microbiota

vaginal saudável, pois a manutenção de um pH baixo (entre 3 e 4,5) impediria o crescimento de patógenos como *Candida* [13, 18, 92, 96].

A produção de ácidos orgânicos parece ser um importante mecanismo de ação na inibição de crescimento de *Candida*, pois agiria não só localmente, ou em contato com as hifas das leveduras. A acidificação do meio impediria o crescimento do patógeno mesmo que estes não estivessem coagregados. Também o fato do ácido láctico facilitar a aderência do lactobacilo ao epitélio, seria um importante mecanismo de ação na prevenção da colonização dos patógenos como *C. albicans*, através deste mecanismo, segundo alguns estudos [19, 31, 45, 87], a ação preventiva dos probióticos seria muito mais significativa do que a terapêutica em relação às candidoses.

O fato de a produção de ácidos orgânicos ter se mantido num patamar com todas *Candida* spp. e mesmo assim haver inibição somente para algumas espécies da levedura, parece um mecanismo de defesa do patógeno e não uma falta de ação dos lactobacilos. Também o fato de todos os lactobacilos testados terem uma produção significativa de ácidos, e *L. acidophilus* NCFM ser um pior inibidor que as cepas de *L. rhamnosus* foi explicado por Velraeds et al. [116], que afirmaram que um mesmo subproduto de diferentes cepas probióticas teriam ação diferente sobre um determinado patógeno.

Este estudo também buscou avaliar o comportamento das culturas e co-culturas das leveduras e lactobacilos conforme o tempo. Para isso foram observadas a contagem de log UFC/ml, de cada um dos micro-organismos, a variação de pH e a curva de crescimento de cada cultura e co-cultura.

Ao observar as contagens de UFC, notou-se que, quanto aos lactobacilos, a presença de *Candida* não causou grandes mudanças nos valores obtidos em relação às culturas puras. O estudo de Young et al. [96] notou um aumento nas contagens de lactobacilos nas co-culturas e atribuiu a isso o fato, já reconhecido na literatura [96-98], de que as leveduras serviriam de estimulantes nutricionais a estes micro-organismos. Embora não tenha sido observado este aumento na contagem, haveria um estímulo nutricional por parte das leveduras [98]. Uma vez que em meio líquido as duas culturas competem por nutrientes, ainda assim os lactobacilos se destacaram mantendo suas contagens muito próximas a das suas culturas puras, demonstrando-se mais eficientes que as leveduras em condições limite de nutrientes. Já em relação às contagens das culturas de *Candida*, os dados mostram

que a contagem de log UFC/ ml foi reduzida para todas as espécies, mas especialmente para *C. albicans* e *C. dubliniensis*. O fato de *C. glabrata* e *C. krusei*, também terem diminuído a contagem de UFC/ml nas co-culturas sugere uma competição nutricional, uma vez que os testes anteriores demonstraram que estas espécies não são inibidas pelos lactobacilos em questão.

Reduções nas contagens de UFC de *C. albicans* na presença de lactobacilos também foram obtidas em estudos anteriores [96, 98, 99], reforçando a capacidade dos probióticos em combater a ação deste patógeno.

Ao analisar o fato dos picos de contagem de lactobacilos coincidirem com a máxima da redução de contagem das leveduras, pode-se atribuir este fato ou a competição nutricional dos micro-organismos coabitantes ao meio líquido ou pela ação dos subprodutos [14, 15, 27, 49, 96, 100, 104, 106, 107, 111, 112] dos probióticos. Daí a importância dos testes individuais de cada subproduto que foram realizados neste trabalho.

Os resultados deste trabalho concordam com o já descrito anteriormente por Koser et al. [98], que as contagens de *C. albicans* em associação com lactobacilos não atingiram contagens elevadas como quando cresce no mesmo meio em cultura pura.

A limitação deste ensaio quanto à utilização de meio líquido, caldo de MRS, é que por vezes este tipo de meio se torna escasso em nutrientes devido à taxa de multiplicação dos micro-organismos, e, havendo uma diminuição no aporte de nutrientes, a multiplicação destes micro-organismos passa a ser prejudicada. Isso explica o fato de algumas culturas puras terem seu pico em 24h, enquanto outras em 48h. Para suprir esta limitação foi analisada também a curva de crescimento das culturas. Uma vez que a medição da absorbância nos mostraria se o crescimento das culturas fosse interrompido em determinado momento do experimento.

Nesta análise observou-se o crescimento dos micro-organismos nas amostras. A limitação deste método, para este estudo, é que nele não se consegue separar os micro-organismos para que se analize a supressão de um elemento da co-cultura frente ao outro. Sendo assim, esperava-se que se não houvesse inibição de *Candida* a curva de crescimento da co-cultura ultrapassaria os valores das duas curvas de culturas puras, controles desta amostra. Caso houvesse inibição de *Candida*, esta curva seria semelhante a das culturas puras dos lactobacilos em questão. Os resultados demonstraram que as curvas das co-culturas em geral

acompanharam os valores das culturas de lactobacilos. Somente houve pico de contagem superiores em alguns momentos nas co-culturas com *C. glabrata* e *C. krusei*. Todas as curvas demonstraram estabilização ente t=24h e t=48h, mostrando uma saturação do meio de cultura, e explicando a redução de contagem de UFC parta todas as culturas no teste anterior.

Quanto as análises do pH das culturas estudadas, houve concordância com os achados da literatura que disseram que as culturas puras de *Lactobacillus* após t=24h estariam mais fortemente ácidas que as culturas de *Candida*. Nesse estudo foram encontrados valores entre 3,8 e 4,5 para os lactobacilos e entre 5,3 a 6,3, valores muito semelhantes aos de outros estudos [96]. As culturas de *L. acidophilus* NCFM foram as que apresentaram menor acidificação de seu pH, cerca de 4 na presença de *Candida*. Enquanto que os *L. rhamnosus* apresentaram uma maior acidificação. Também foi observado que a partir de t=10h essa acidificação se torna perceptível. Notou-se também que *L. acidophilus* NCFM, obteve menores valores de pH em suas co-culturas do que em sua cultura pura. A este fato também se pode atribuir um estímulo nutricional [96] proporcionado pela levedura que culminaria num aumento da produção do subproduto deste micro-organismo.

A análise do pH ao longo do tempo permitiu comprovar que mesmo nas co-culturas das espécies que não obtiveram resultado positivo no teste de inibição, houve acidificação do meio, reforçando ainda mais a hipótese de que certas espécies de *Candida* seriam mais ácido tolerantes que outras.

A fim de comprovar a eficácia do ácido láctico ou a resistência de algumas espécies de *Candida* a ele, realizou-se o teste de inibição por ácido láctico. Assim como Young et al. [96], ao adicionar o ácido láctico nas culturas de *Candida* igualando seu pH ao das co-culturas com lactobacilos, esperou-se avaliar se este subproduto somente faria com que as culturas passassem a se comportar, ao longo do tempo, como as suas co-culturas. Esses resultados concordam com Köhler et al. [24], no quesito de que o baixo pH, provocado pela adição do ácido, teria um papel importante na supressão dos fungos, porém esta ação seria dependente da espécie de *Candida* em questão.

Aparentemente para *C. albicans* a produção de ácido láctico é muito importante, porém outros mecanismos de ação devem atuar. Uma vez que esse estudo obteve que a redução nas contagens de UFC para estas culturas foi significativamente diferente da obtida nas co-culturas com *L. rhamnosus* Lr-32, que

provocou uma maior redução. Para *C. dubliniensis* este deve ser o principal mecanismo de ação dentre os estudados, já que a análise estatística não demonstrou diferença entre a mesma comparação (cultura acidificada e co-cultura com *L. rhamnosus* Lr-32). Para *C. glabrata* e *C. krusei*, uma vez que estas espécies não foram inibidas pelos lactobacilos, e houve semelhança entre as curvas de crescimento de suas culturas acidificadas com as respectivas culturas puras, estas espécies seriam resistentes ao ácido.

Assim, o presente estudo pôde comprovar que as bactérias probióticas de origem intestinal possuem a capacidade de inibir o patógeno oral *Candida*, e que esta inibição é espécie dependente para os dois micro-organismos. Quanto aos mecanismos de ação avaliados, percebeu-se que não há ação de um mecanismo puramente, sendo aparentemente multifatorial o processo de inibição. Embora o ácido láctico nos pareça o mecanismo de ação mais importante dentre os estudados, outros atuam para o resultado final, especialmente com *C. albicans*.

Neste sentido, para aprimorar a utilização desta terapia, esse estudo contribuiu indicando quais cepas de lactobacilos seriam as mais indicadas, e iniciou uma elucidação sobre os mecanismos de ação. Outros mecanismos de ação necessitam ser investigados, como o bloqueio de receptores de adesinas para *Candida* spp. nas células epiteliais e a modulação do sistema imune do hospedeiro. Esta modulação parece estar fortemente vinculada ao sucesso desta terapia. Alguns estudos mostram um efeito indireto dos lactobacilos, que inoculados em cavidade gastrointestinal, causaram uma diminuição na colonização de patógenos nas cavidades oral e vaginal [30, 127].

Também necessitam ser investigadas as causas da resistência de algumas espécies de *Candida*. Talvez a chave da problemática da estomatite sob prótese esteja em driblar os mecanismos de defesa das espécies mais virulentas, associando assim, conhecimentos de mecanismos de ação de probióticos e mecanismos de defesa das espécies de *Candida*, será possível chegar a uma terapia alternativa eficaz à prevenção e ao tratamento das candidoses orais.

7 CONCLUSÕES

Nós concluímos que:

- Foi possível detectar a produção e peróxido de hidrogênio pelos lactobacilos *L. acidophilus* NCFM, *L. rhamnosus* Lr-32 e *L. rhamnosus* HN001-Howaru[®], porém este mecanismo não pôde ser destacado como o responsável pela inibição de *Candida*;
- Os índices de coagregação obtidos estiveram diretamente relacionados capacidade de inibição dos micro-organismos;
- Houve intensa produção de ácido láctico em culturas e co-culturas. A produção variou de acordo com a cepa de lactobacilo presente na co-cultura;
- A presença de *Candida* não alterou as contagens de UFC dos lactobacilos. Já a presença de lactobacilos provocou redução nas contagens de *Candida*, especialmente *C. albicans* e *C. dubliniensis*;
- As curvas de crescimento e de pH mostraram que o comportamento das co-culturas é semelhante ao das culturas de lactobacilos;
- A análise de pH mostrou que a acidificação ocorreu em todas as culturas, porém *L. rhamnosus* Lr-32 e *L. rhamnosus* HN001-Howaru[®] promoveram uma maior acidificação;
- O ácido láctico foi identificado como o mecanismo de ação mais importante dentre os estudados, sendo capaz de reduzir a contagem de UFC e alterar as curvas de crescimento de *C. albicans* e *C. dubliniensis*;
- A inibição de *Candida* ocorre através de múltiplos fatores que podem variar de acordo com as espécies de *Lactobacillus* e *Candida* presentes. Para *C. dubliniensis* o ácido láctico demonstrou-se o mecanismo mais significativo, enquanto que para *C. albicans* além do ácido láctico outros mecanismos devem estar envolvidos na inibição.

REFERÊNCIAS¹

- 1 Oliveira TRC, Frigerio MLMA, Yamada MCM, Birman EG. Avaliação da estomatite protética em portadores de próteses totais. *Pesqui Odontol Bras.* 2000;14(3):219-24.
- 2 Neville BD, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. *Patologia Oral e Maxilofacial.* 3ª ed. Rio de Janeiro. Elsevier;. 2009.
- 3 Budtz-Jorgensen E. The significance of *Candida albicans* in denture stomatitis. *Scand J Dent Res.* 1974;82(2):151-90.
- 4 Wright PS, Clark P, Hardie JM. The prevalence and significance of yeasts in persons wearing complete dentures with soft-lining materials. *J Dent Res.* 1985;64(2):122-5.
- 5 Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J* 2002;78(922):455-9.
- 6 Epstein JB. Antifungal therapy in oropharyngeal mycotic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1990;69(1):32-41.
- 7 Lewis MA, Samaranyake LP, Lamey PJ. Diagnosis and treatment of oral candidosis. *J Oral Maxillofac Surg.* 1991;49(9):996-1002.
- 8 Samaranyake LP. Oral mycoses in HIV infection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1992;73(2):171-80.
- 9 Webb BC, Thomas CJ, Willcox MD, Harty DW, Knox K W. *Candida*-associated denture stomatitis. A etiology and management: a review. Part 2. Oral diseases caused by *Candida* species. *Aust Dent J.* 1998;43(3):160-6.
- 10 Scalercio MV, Valente T, Israel MS, Ramos ME. Estomatite protética versus Candidose: diagnóstico e tratamento. *RGO.* 2007;55(4):395-98.

¹ De acordo com o Estilo Vancouver

- 11 Gendreau L, Loewy LG. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *J Prosthodont.* 2011;20(4):251-60.
- 12 Brzozowski T, Zwolinska-Wcislo M, Konturek PC, Kwiecien S, Drozdowicz D, Konturek SJ, et al. Influence of gastric colonization with *Candida albicans* on ulcer healing in rats: effect of ranitidine, aspirin and probiotic therapy. *Scand J Gastroenterol.* 2005;40(3):286-96.
- 13 Köhler GA, Assefa S, Reid G. Probiotic interference of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus reuteri* RC-14 with the opportunistic fungal pathogen *Candida albicans*. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2012;63-74.
- 14 Rodrigues L, van der Mei HC, Teixeira J, Oliveira R. Influence of biosurfactants from probiotic bacteria on formation of biofilms on voice prostheses. *Appl Environ Microbiol.* 2004; 70(7):4408-10.
- 15 Rodrigues L, van der Mei H, Banat IM, Teixeira J, Oliveira R. Inhibition of microbial adhesion to silicone rubber treated with biosurfactant from *Streptococcus thermophilus* A. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2006;46(1):107-12.
- 16 Pfaller, MA. Epidemiology of candidiasis. *J Hosp Infect.* 1995;30 Suppl:329-38.
- 17 Radford DR, Challacombe SJ, Walter JD. Denture plaque and adherence of *Candida albicans* to denture-base materials *in vivo* and *in vitro*. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1999;10(1): 99-116.
- 18 Valore EV, Park CH, Igreti SL, Ganz T. Antimicrobial components of vaginal fluid. *Am J Obstet Gynecol.* 2002;187(3):561-8.
- 19 Falagas ME, Betsi GI, Athanasiou S. Probiotics for prevention of recurrent vulvovaginal candidiasis: a review. *J Antimicrob Chemother.* 2006;58(2):266-72
- 20 Budtz-Jorgensen E, Mojon P, Rentsch A, Deslauriers N. Effects of an oral health program on the occurrence of oral candidosis in a long-term care facility. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2000;28(2):141-9.
- 21 de Andrade IM, Cruz PC, da Silva CH, de Souza RF, Paranhos H de F, Candido RC, et al. Effervescent tablets and ultrasonic devices against *Candida* and *mutans streptococci* in denture biofilm. *Gerodontology.* 2011;28(4):264-70.

- 22 Belazi M, Velegraki A, Koussidou-Eremondi T, Andreadis D, Hini S, Arsenis G, et al. Oral *Candida* isolates in patients undergoing radiotherapy for head and neck cancer: prevalence, azole susceptibility profiles and response to antifungal treatment. *Oral Microbiol Immunol*. 2004;19(6): 347-51.
- 23 Sanglard D, Odds FC. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis*. 2002;2(2):73-85.
- 24 Balish E, Wagner RD. Wagner, Probiotic bacteria for prophylaxis and therapy of candidiasis. *Rev Iberoam Micol*. 1998;15(4):261-4.
- 25 Matsubara VH, Silva EG, Paula CR, Ishikawa KH, Nakamae AE. Treatment with probiotics in experimental oral colonization by *Candida albicans* in murine model (DBA/2). *Oral Dis*. 2012;18(3):260-4.
- 26 Ishikawa KH. Utilização de probióticos para o controle da prevalência de *Candida* oral em pacientes edentados totais [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia. 2011.
- 27 Martinez RCR. Efeito da utilização de culturas lácticas probióticas na microbiota vaginal de pacientes acometidas por infecções fúngicas [tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. 2008.
- 28 Martinez RC, Franceschini SA, Patta MC, Quintana SM, Candido RC, Ferreira JC, et al. Improved treatment of vulvovaginal candidiasis with fluconazole plus probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus reuteri* RC-14. *Lett Appl Microbiol*. 2009;48(3):269-74.
- 29 Sanders ME. Probiotics: considerations for human health. *Nutr Rev*. 2003; 61(3): 91-9.
- 30 Elahi S, Pang G, Ashman R, Clancy R. Enhanced clearance of *Candida albicans* from the oral cavities of mice following oral administration of *Lactobacillus acidophilus*. *Clin Exp Immunol*. 2005;141(1):29-36.
- 31 Vicariotto F, Del Piano M, Mogna L, Mogna G. Effectiveness of the association of 2 probiotic strains formulated in a slow release vaginal product, in women affected by vulvovaginal candidiasis: a pilot study. *J Clin Gastroenterol*. 2012;46 Suppl:S73-80.

- 32 Kilic K, Koc AN, Tekinsen FF, Yildiz P, Kilic D, Zararsiz G, et al. Assessment of *Candida* Species colonization and denture-related stomatitis in bar- and locator-retained overdentures. J Oral Implantol. 2012;Sep 28.
- 33 Mailander-Sanchez D, Wagener J, Schaller M. Potential role of probiotic bacteria in the treatment and prevention of localised candidosis. Mycoses. 2012;55(1):17-26.
- 34 Forestier C, De Champs C, Vatoux C, Joly B. Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. Res Microbiol. 2001;152(2):167-73.
- 35 Epstein JB, Polsky B. Oropharyngeal candidiasis: a review of its clinical spectrum and current therapies. Clin Ther. 1998;20(1):40-57.
- 36 Lucas VS. Association of psychotropic drugs, prevalence of denture-related stomatitis and oral candidosis. Community Dent Oral Epidemiol. 1993;21(5):313-6.
- 37 Lockhart SR, Joly S, Vargas K, Swails-Wenger J, Enger L, Soll DR. Natural defenses against *Candida* colonization breakdown in the oral cavities of the elderly. J Dent Res. 1999;78(4):857-68.
- 38 Morgan R, Tsang J, Harrington N, Fook L. Survey of hospital doctors' attitudes and knowledge of oral conditions in older patients. Postgrad Med J. 2001; 77(908): 392-4.
- 39 Barkvoll P, Attramadal A. Effect of nystatin and chlorhexidine digluconate on *Candida albicans*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1989;67(3):279-81.
- 40 Marcos-Arias C, Eraso E, Madariaga L, Quindos G. In vitro activities of natural products against oral *Candida* isolates from denture wearers. BMC Complement Altern Med. 2011;11:119.
- 41 Barbeau J, Seguin J, Goulet JP, de Koninck L, Avon SL, Lalonde B, et al. Reassessing the presence of *Candida albicans* in denture-related stomatitis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2003;95(1):51-9.

- 42 Salerno C, Pascale M, Contaldo M, Esposito V, Busciolano M, Milillo L, et al. *Candida*-associated denture stomatitis. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2011;16(2):139-43.
- 43 Perezous LF, Flaitz CM, Goldschmidt ME, Engelmeier RL. Colonization of *Candida* species in denture wearers with emphasis on HIV infection: a literature review. J Prosthet Dent. 2005;93(3):288-93.
- 44 Sato M, Ohshima T, Maeda N, Ohkubo C. Inhibitory effect of coated mannan against the adhesion of *Candida* biofilms to denture base resin. Dent Mater J. 2013;32(3):355-60.
- 45 Redding S, Bhatt B, Rawls HR, Siegel G, Scott K, Lopez-Ribot J. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation on denture material. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2009;107(5):669-72.
- 46 Nayak S, Kavitha B, Sriram G, Saraswathi TR, Sivapathasundharam B, Dorothy AL. Comparative study of *Candida* by conventional and CHROMagar method in non-denture and denture wearers by oral rinse technique. Indian J Dent Res. 2012; 23(4):490-7.
- 47 Darwazeh AM, Al-Refai S, Al-Mojaiwel S. Isolation of *Candida* species from the oral cavity and fingertips of complete denture wearers. J Prosthet Dent. 2001; 86(4):420-3.
- 48 Budtz-Jorgensen E, Stenderup A, Grabowski M. An epidemiologic study of yeasts in elderly denture wearers. Community Dent Oral Epidemiol. 1975;3(3):115-9.
- 49 Ocaña VS, Pesce de Ruiz Holgado AA, Nader-Macias ME. Selection of vaginal H₂O₂-generating *Lactobacillus* species for probiotic use. Curr Microbiol. 1999; 38(5):279-84.
- 50 França JC BR, Ribeiro CEL, Queiroz-Telles F. Candidemia em um hospital terciário brasileiro: incidência, frequência das diferentes espécies, fatores de risco e suscetibilidade aos antifúngicos. Rev Soc Bras Med Trop. 2008;41(1):23-28.
- 51 Zomorodian K, Haghighi NN, Rajaei N, Pakshir K, Tarazooie B, Vojdani M, et al. Assessment of *Candida* species colonization and denture-related stomatitis in complete denture wearers. Med Mycol. 2011;49(2):208-11.

- 52 Gasparoto TH, Dionisio TJ, de Oliveira CE, Porto VC, Gelani V, Santos CF, et al. Isolation of *Candida dubliniensis* from denture wearers. J Med Microbiol. 2009; 58 (Pt7):959-62.
- 53 Odds FC. *Candida* infections: an overview. Crit Rev Microbiol. 1987;15(1):1-5.
- 54 Al-Karaawi ZM, Manfredi M, Waugh AC, McCullough MJ, Jorge J, Scully C, et al. Molecular characterization of *Candida* spp. isolated from the oral cavities of patients from diverse clinical settings. Oral Microbiol Immunol. 2002;17(1):44-9.
- 55 Coco BJ, Bagg J, Cross LJ, Jose A, Cross J, Ramage G. Mixed *Candida albicans* and *Candida glabrata* populations associated with the pathogenesis of denture stomatitis. Oral Microbiol Immunol. 2008;23(5):377-83.
- 56 Sanitá PV, Pavarina AC, Giampaolo ET, Silva MM, Mima EG, Ribeiro DG, et al. *Candida* spp. prevalence in well controlled type 2 diabetic patients with denture stomatitis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2011;111(6):726-33.
- 57 Felton D, Cooper L, Duqum I, Minsley G, Guckes A, Haug S, et al. Evidence-based guidelines for the care and maintenance of complete dentures: a publication of the American College of Prosthodontists. J Am Dent Assoc. 2011;142 Suppl2:1S-20S.
- 58 Stafford GD, Arendorf T, Huggett R. The effect of overnight drying and water immersion on candidal colonization and properties of complete dentures. J Dent. 1986;14(2):52-6.
- 59 Gupta AK, Sauder DN, Shear NH. Antifungal agents: an overview. Part I. J Am Acad Dermatol. 1994;30(5 Pt 1):677-98.
- 60 da Costa KR, Ferreira JC, Komesu MC, Candido RC. *Candida albicans* and *Candida tropicalis* in oral candidosis: quantitative analysis, exoenzyme activity, and antifungal drug sensitivity. Mycopathologia. 2009;167(2):73-9.
- 61 Seelig, MS. The role of antibiotics in the pathogenesis of *Candida* infections. Am J Med. 1966;40(6):887-917.
- 62 Mima EG, Pavarina AC, Dovigo LN, Vergani CE, Costa CA, Kurachi C, et al. Susceptibility of *Candida albicans* to photodynamic therapy in a murine model of oral

candidosis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2010;109(3):392-401.

63 Krcmery V, Barnes AJ. Non-*albicans* *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. J Hosp Infect. 2002;50(4):243-60.

64 Colombo AL, Nucci M, Salomao R, Branchini ML, Richtmann R, Derossi A, et al. High rate of non-*albicans* candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. Diagn Microbiol Infect Dis. 1999;34(4):281-6.

65 Asmundsdottir LR, Erlendsdottir H, Gottfredsson M. Nationwide study of candidemia, antifungal use and antifungal drug resistance in Iceland 2000-2011. J Clin Microbiol. 2013; 51(3):841-8.

66 Cleveland AA, Farley MM, Harrison LH, Stein B, Hollick R, Lockhart SR, et al. Changes in incidence and antifungal drug resistance in candidemia: results from population-based laboratory surveillance in Atlanta and Baltimore, 2008-2011. Clin Infect Dis. 2012; 55(10):1352-61.

67 Capistrano HM, de Assis EM, Leal RM, Alvarez-Leite ME, Brener S, Bastos EM. Brazilian green propolis compared to miconazole gel in the treatment of *Candida*-associated denture stomatitis. Evid Based Complement Alternat Med. 2013; 1-6

68 Cutler JE, Friedman L, Milner KC. Biological and chemical characterization of toxic substances from *Candida albicans*. Infect Immun. 1972;6(4):616-27.

69 Kwon-Chung KJ, Lehman D, Good C, Magee PT. Genetic evidence for role of extracellular proteinase in virulence of *Candida albicans*. Infect Immun. 1985;49(3):571-5.

70 Slutsky B, Buffo J, Soll DR. High-frequency switching of colony morphology in *Candida albicans*. Science. 1985;230(4726):666-9.

71 Abaci, O. Investigation of extracellular phospholipase and proteinase activities of *Candida species* isolated from individuals denture wearers and genotypic distribution of *Candida albicans* strains. Curr Microbiol. 2011;62(4):1308-14.

72 Ghannoum MA, Burns GR, Elteen KA, Radwan SS. Experimental evidence for the role of lipids in adherence of *Candida* spp. to human buccal epithelial cells. Infect Immun. 1986;54(1):189-93.

- 73 Aguirre M, Collins MD. Lactic acid bacteria and human clinical infection. *J Appl Bacteriol.* 1993;75(2):95-107.
- 74 Clancy R. Immunobiotics and the probiotic evolution. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2003;38(1):9-12.
- 75 World Health Organization. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria in Food and Agriculture Organization of the United Nations WHO. 2001;Córdoba.
- 76 Quigley EM. Gut microbiota and the role of probiotics in therapy. *Curr Opin Pharmacol.* 2011;11(6):593-603.
- 77 Puupponen-Pimiä R, Aura, A.-M, Oksman-Caldentey, K.-M. Myllärinen, P, Saarela M, Mattila-Sandholm T, Poutanen K. Development of functional ingredients for gut health. *Trends Food Sci Technol.* 2002;13:3-11.
- 78 Kaur IP, Chopra K, Saini A., Probiotics: potential pharmaceutical applications. *Eur J Pharm Sci.* 2002;15(1):1-9.
- 79 Reid G. The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65(9):3763-6.
- 80 Kumar S, Bansal A, Chakrabarti A, Singhi S. Evaluation of efficacy of probiotics in prevention of *Candida* colonization in a PICU-a randomized controlled trial. *Crit Care Med.* 2013;41(2):565-72.
- 81 Borriello SP, Hammes WP, Holzapfel W, Marteau P, Schrezenmeir J, Vaara M, et al. Safety of probiotics that contain lactobacilli or *bifidobacteria*. *Clin Infect Dis.* 2003;36(6):775-80.
- 82 Meadows-Oliver M, Reid V. Use of probiotics in pediatrics. *J Pediatr Health Care.* 2009;23(3):194-7.
- 83 Klinke T, Kneist S, de Soet JJ, Kuhlisch E, Mauersberger S, Forster A, et al. Acid production by oral strains of *Candida albicans* and lactobacilli. *Caries Res.* 2009; 43(2):83-91.
- 84 Sanders ME, Akkermans LM, Haller D, Hammerman C, Heimbach J, Hormannsperger G, et al. Safety assessment of probiotics for human use. *Gut Microbes.* 2010;1(3):164-85.

- 85 Charteris WP, Kelly PM, Morelli L, Collins JK. Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods. *Int J Dairy Technol.* 1998; 51(4):123-136.
- 86 Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr.* 1995;125(6):1401-12.
- 87 Demirel G, Celik IH, Erdeve O, Saygan S, Dilmen U, Canpolat FE. Prophylactic *Saccharomyces boulardii* versus nystatin for the prevention of fungal colonization and invasive fungal infection in premature infants. *Eur J Pediatr.* 2013; 172(10):1321-6
- 88 Goldin BR, Gorbach SL. Clinical indications for probiotics: an overview. *Clin Infect Dis.* 2008; 46 (Suppl2) :S96-100.
- 89 Wagner RD, Johnson SJ. Probiotic *Lactobacillus* and estrogen effects on vaginal epithelial gene expression responses to *Candida albicans*. *J Biomed Sci.* 2012;19:58.
- 90 Reid G. Probiotic agents to protect the urogenital tract against infection. *Am J Clin Nutr.* 2001;73(2Suppl):437S-443S.
- 91 Martinez RC, Franceschini SA, Patta MC, Quintana SM, Gomes BC, De Martinis EC, et al. Improved cure of bacterial vaginosis with single dose of tinidazole (2 g), *Lactobacillus rhamnosus* GR-1, and *Lactobacillus reuteri* RC-14: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Can J Microbiol.* 2009;55(2):133-8.
- 92 Gil NF, Martinez RCR, Gomes BC, Nomizo A, De Martinis ECP. Vaginal *Lactobacilli* as potencial probiotics against *Candida* spp. *Braz J Microbiol.* 2010; 41(1):6-14.
- 93 Reid G, Burton J. Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. *Microbes Infect.* 2002;4(3):319-24.
- 94 Iwamoto T, Suzuki N, Tanabe K, Takeshita T, Hirofuji T. Effects of probiotic *Lactobacillus salivarius* WB21 on halitosis and oral health: an open-label pilot trial. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010;110(2):201-8.

- 95 Flichy-Fernandez AJ, Alegre-Domingo T, Penarrocha-Oltra D, Penarrocha-Diago M. Probiotic treatment in the oral cavity: an update. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2010;15(5):677-80.
- 96 Young G, Krasner RI, Yudkofsky PL. Interactions of oral strains of *Candida albicans* and lactobacilli. *J Bacteriol*. 1956;72(4):525-9.
- 97 Wilson TE, Goaz PW. The oral yeast-*Lactobacillus* relationship. III. Growth enhancement of *Lactobacillus casei* by *Candida albicans* and saliva. *J Dent Res*. 1960;39:365-71.
- 98 Koser SA, Hodges E, Tribby I, Stuedell JT. Growth of lactobacilli in association with *Candida albicans*. *J Infect Dis*. 1960;106:60-8.
- 99 Hatakka K, Ahola AJ, Yli-Knuuttila H, Richardson M, Poussa T, Meurman JH, et al. Probiotics reduce the prevalence of oral *Candida* in the elderly-a randomized controlled trial. *J Dent Res*. 2007;86(2):125-30.
- 100 Hasslof P, Hedberg M, Twetman S, Stecksén-Blicks C. Growth inhibition of oral *mutans Streptococci* and *Candida* by commercial probiotic lactobacilli-an *in vitro* study. *BMC Oral Health*. 2010;10:18.
- 101 Ishijima SA, Hayama K, Burton JP, Reid G, Okada M, Matsushita Y, et al. Effect of *Streptococcus salivarius* K12 on the in vitro growth of *Candida albicans* and its protective effect in an oral candidiasis model. *Appl Environ Microbiol*. 2012; 78 (7): 2190-9.
- 102 Mombelli B, Gismondo MR. The use of probiotics in medical practice. *Int J Antimicrob Agents*. 2000;16(4):531-6.
- 103 Kennedy MJ, Volz PA. Ecology of *Candida albicans* gut colonization: inhibition of *Candida* adhesion, colonization, and dissemination from the gastrointestinal tract by bacterial antagonism. *Infect Immun*. 1985;49(3):654-63.
- 104 Boris S, Suarez JE, Vazquez F, Barbes C. Adherence of human vaginal lactobacilli to vaginal epithelial cells and interaction with uropathogens. *Infect Immun*. 1998;66(5):1985-9.
- 105 Chan RC, Reid G, Irvin RT, Bruce AW, Costerton JW. Competitive exclusion of uropathogens from human uroepithelial cells by *Lactobacillus* whole cells and cell wall fragments. *Infect Immun*. 1985;47(1):84-9.

- 106 Redondo-Lopez V, Cook RL, Sobel JD. Emerging role of lactobacilli in the control and maintenance of the vaginal bacterial microflora. *Rev Infect Dis.* 1990;12(5):856-72.
- 107 Mastromarino P, Brigidi P, Macchia S, Maggi L, Pirovano F, Trinchieri V, et al. Characterization and selection of vaginal *Lactobacillus* strains for the preparation of vaginal tablets. *J Appl Microbiol.* 2002;93(5):884-93.
- 108 Barefoot SF, Klaenhammer TR. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microbiol.* 1983;45(6):1808-15.
- 109 González-Martínez BE, Gómez-Treviño M, Jiménez-Salas Z. Bacteriocinas de probióticos. *RESPYN.* 2003;4(2).
- 110 Burton JP, Chilcott CN, Moore CJ, Speiser G, Tagg JR. A preliminary study of the effect of probiotic *Streptococcus salivarius* K12 on oral malodour parameters. *J Appl Microbiol.* 2006;100(4):754-64.
- 111 Fontes GC, Amaral PFF, Coelho MAZ. Produção de biosurfactante por levedura. *Quím Nova.* 2008;31(08):2091-9.
- 112 Busscher HJ, van Hoogmoed CG, Geertsema-Doornbusch GI, van der Kuijl-Booij M, van der Mei HC. *Streptococcus thermophilus* and its biosurfactants inhibit adhesion by *Candida* spp. on silicone rubber. *Appl Environ Microbiol.* 1997; 63(10): 3810-7.
- 113 Aroutcheva A, Gariti D, Simon M, Shott S, Faro J, Simoes JA, et al. Defense factors of vaginal lactobacilli. *Am J Obstet Gynecol.* 2001;185(2):375-9.
- 114 Altermann E, Russell WM, Azcarate-Peril MA, Barrangou R, Buck BL, McAuliffe O, et al. Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(11):3906-12.
- 115 Fracchia L, Cavallo M, Allegrone G, Martinotti MG. A *Lactobacillus*-derived biosurfactant inhibits biofilm formation of human pathogenic *Candida albicans* biofilm producers. *Cur Res Technol Educ App Microbiol Microbial Biotechnol*,2010; 2: 827-37.

- 116 Velraeds MM, van der Mei HC, Reid G, Busscher HJ. Inhibition of initial adhesion of uropathogenic *Enterococcus faecalis* by biosurfactants from *Lactobacillus* isolates. *Appl Environ Microbiol*. 1996;62(6):1958-63.
- 117 Berthier, F. On the screening of hydrogen peroxide-generating lactic acid bacteria. *Lett AppMicrobiol*. 1993;16:150-153.
- 118 Fontaine EA, Taylor-Robinson D. Comparison of quantitative and qualitative methods of detecting hydrogen peroxide produced by human vaginal strains of lactobacilli. *J Appl Bacteriol*. 1990;69(3):326-31.
- 119 Hawes SE, Hillier SL, Benedetti J, Stevens CE, Koutsky LA, Wolner-Hanssen P, et al. Hydrogen peroxide-producing lactobacilli and acquisition of vaginal infections. *J Infect Dis*. 1996;174(5):1058-63.
- 120 Eschenbach DA, Davick PR, Williams BL, Klebanoff SJ, Young-Smith K, Critchlow CM, et al. Prevalence of hydrogen peroxide-producing *Lactobacillus* species in normal women and women with bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol*. 1989;27(2):251-6.
- 121 Wilks M, Wiggins R, Whiley A, Hennessy E, Warwick S, Porter H, et al. Identification and H₂O₂ production of vaginal lactobacilli from pregnant women at high risk of preterm birth and relation with outcome. *J Clin Microbiol*. 2004;42(2):713-7.
- 122 Strus M, Kucharska A, Kukla G, Brzywczy-Wloch M, Maresz K, Heczko PB. The in vitro activity of vaginal *Lactobacillus* with probiotic properties against *Candida*. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2005;13(2):69-75.
- 123 Fitzsimmons N, Berry DR. Inhibition of *Candida albicans* by *Lactobacillus acidophilus*: evidence for the involvement of a peroxidase system. *Microbios*. 1994;80(323):125-33.
- 124 Reid G, Jacqueline A. McGroarty JA, Gil Domingue PAG, Chow AW, Bruce AW, Eisen A, et al. Coaggregation of urogenital bacteria in vitro and in vivo. *Curr Microbiol*. 1990;20:47-52.
- 125 Edema MO, Sanni AI. Functional properties of selected starter cultures for sour maize bread. *Food Microbiol*. 2008;25(4):616-25.

126 Koll P, Mandar R, Marcotte H, Leibur E, Mikelsaar M, Hammarstrom L. Characterization of oral lactobacilli as potential probiotics for oral health. *Oral Microbiol Immunol*. 2008;23(2):139-47.

127 Vieira AT, Teixeira MM, Martins FS. The role of probiotics and prebiotics in inducing gut immunity. *Front Immunol*. 2013;12(4): 445.

APÊNDICE A – Gráficos de alteração do pH das culturas de *Candida*, *Lactobacillus* e co-culturas ao longo do tempo

Gráfico A.1. Alteração do pH das culturas de *L. rhamnosus* Lr-32 e *C. albicans* 10231 ao longo do tempo

Gráfico A.2- Alteração do pH das culturas de *L. rhamnosus* Lr-32 e *C. albicans* 90028 ao longo do tempo

Gráfico A.3 - Alteração do pH das culturas de *L. rhamnosus* Lr-32 e *C. glabrata* 15126 ao longo do tempo

Gráfico A.4 - Alteração do pH das culturas de *L. rhamnosus* Lr-32 e *C. krusei* 6258 ao longo do tempo

Gráfico A.5 - Alteração do pH das culturas de *L. rhamnosus* Lr-32 e *C. dubliniensis* (A47) ao longo do tempo

Gráfico A.6 - Alteração do pH das culturas de *L. rhamnosus* Lr-32 e *C. albicans* (A53) longo do tempo

Gráfico A.7 - Alteração do pH das culturas de *L. rhamnosus* HN001- Howaru® e *C. albicans* 10231 ao longo do tempo

Gráfico A.8 - Alteração do pH das culturas de *L. rhamnosus* HN001- Howaru® e *C. albicans* 90028 ao longo do tempo

Gráfico A.9- Alteração do pH das culturas de *L. rhamnosus* HN001- Howaru® e *C. glabrata* 15126 longo do tempo

Gráfico A.10 - Alteração do pH das culturas de *L. rhamnosus* HN001- Howaru® e *C. krusei* 6258 longo do tempo

Gráfico A.11 - Alteração do pH das culturas de *L. rhamnosus* HN001- Howaru® e *C. dubliniensis* (A47) ao longo do tempo

Gráfico A.12 - Alteração do pH das culturas de *L. rhamnosus* HN001- Howaru® e *C. albicans* (A53) ao longo do tempo

Gráfico A.13 - Alteração do pH das culturas de *L. acidophilus* NCFM e *C. albicans* 10231 ao longo do tempo

Gráfico A.14 - Alteração do pH das culturas de *L. acidophilus* NCFM e *C. albicans* 90028 ao longo do tempo

Gráfico A.15 - Alteração do pH das culturas de *L. acidophilus* NCFM e *C. glabrata* 15126 ao longo do tempo

Gráfico A.16 - Alteração do pH das culturas de *L. acidophilus* NCFM e *C. krusei* 6258 ao longo do tempo

Gráfico A.17 - Alteração do pH das culturas de *L. acidophilus* NCFM e *C. dubliniensis* (A47) ao longo do tempo

Gráfico A.18 - Alteração do pH das culturas de *L. acidophilus* NCFM e *C. albicans* 53 ao longo do tempo

APÊNDICE B – Gráficos das Curvas de Crescimento das culturas e co-culturas de *Candida* e *Lactobacillus*

Gráfico B.1 - Curvas de Crescimento das culturas de *L. rhamnosus* Lr-32 e *C. albicans* 10231

Gráfico B.2 - Curvas de Crescimento das culturas de *L. rhamnosus* Lr-32 e *C. glabrata* 15126

Gráfico B.3 - Curvas de Crescimento das culturas de *L. rhamnosus* Lr-32 e *C. krusei* 6258 Gráfico B.4 - Curvas de Crescimento das culturas de *L. rhamnosus* Lr-32 e *C. albicans* (A42) Gráfico B.5 - Curvas de Crescimento das culturas de *L. rhamnosus* Lr-32 e *C. dubliniensis* (A47)

Gráfico B.6 - Curvas de Crescimento das culturas de *L. rhamnosus* Lr-32 e *C. albicans* (A53)

Gráfico B.7 - Curvas de Crescimento das culturas de *L. rhamnosus* HN001- Howaru® e *C. albicans* 10231

Gráfico B.8 - Curva de Crescimento das culturas de *L. rhamnosus* HN001- Howaru® e *C. albicans* 90028

Gráfico B.9 – Curvas de Crescimento das culturas de *L. rhamnosus* HN001- Howaru® e *C. glabrata* 15126

Gráfico B.10 - Curvas de Crescimento das culturas de *L. rhamnosus* HN001- Howaru® e *C. krusei* 6258

Gráfico B.11 - Curvas de Crescimento das culturas de *L. rhamnosus* HN001- Howaru® e *C. albicans* (A42)

Gráfico B.12 - Curvas de Crescimento das culturas de *L. rhamnosus* HN001- Howaru® e *C. dubliniensis* (A47)

Gráfico B.13 - Curvas de Crescimento das culturas de *L. rhamnosus* HN001- Howaru® e *C. albicans* (A53)

Gráfico B.14 - Curvas de Crescimento das culturas de *L. acidophilus* NCFM e *C. albicans* 10231

Gráfico B.15 - Curvas de Crescimento das culturas de *L. acidophilus* NCFM e *C. albicans* 90028

Gráfico B.16 - Curvas de Crescimento das culturas de *L. acidophilus* NCFM e *C. glabrata* 15126

Gráfico B.17 - Curvas de Crescimento das culturas de *L. acidophilus* NCFM e *C. krusei* 6258

Gráfico B.18 - Curvas de Crescimento das culturas de *L. acidophilus* NCFM e *C. albicans* (A42)

Gráfico B.19 - Curvas de Crescimento das culturas de *L. acidophilus* NCFM e *C. dubliniensis* (A47)

Gráfico B.20 - Curvas de Crescimento das culturas de *L. acidophilus* NCFM e *C. albicans* (A53)