TATIANA YURIKO MIYAZIMA

Queijo minas frescal suplementado com probiótico para o controle de *Candida* sp. isolados da cavidade bucal de usuários de próteses totais- estudo duplo-cego randomizado

São Paulo

2014

TATIANA YURIKO MIYAZIMA

Queijo minas frescal suplementado com probiótico para o controle de *Candida* sp. isolados da cavidade bucal de usuários de próteses totais- estudo duplo-cego randomizado

Versão Original

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

Área de Concentração: Prótese Dentária

Orientador: Prof. Dr. Atlas Edson Moleros Nakamae

São Paulo

2014

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.

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

Miyazima, Tatiana Yuriko.
Queijo minas frescal suplementado com probiótico para o controle de *Candida* sp. isolados da cavidade bucal de usuários de próteses totais – estudo duplo-cego randomizado / Tatiana Yuriko Miyazima; orientador Atlas Edson Moleros Nakamae. – São Paulo, 2014.
133 p. : il. : fig. : tab. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Prótese Dentária. – Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.
Versão original.

1. Probióticos - Odontologia. 2. Candida. 3. Prótese Total. 4. Microbiologia oral. 5. *Lactobacillus*. I. Nakamae, Atlas Edson Moleros. II. Título.

Miyazima TY. Queijo minas frescal suplementado com probiótico para o controle de *Candida* sp. isolados da cavidade bucal de usuários de próteses totais - estudo duplo-cego randomizado. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Odontológicas.

Aprovada em: / /2014

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição:_____Julgamento:_____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição:_____Julgamento:_____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição:_____Julgamento:_____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição:_____Julgamento:_____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição:_____Julgamento:_____

Aos meus pais (*in memorian*) pela vida, por todos os ensinamentos e amor que me permitiram ser quem sou hoje.

Aos meus irmãos, Sayuri e Tsuneo, pelo engrandecimento atráves das difificuldades enfrentadas ao longo destes anos, e pela ajuda que me permitiu realizar esta etapa da minha vida.

Ao Ricardo, pelo apoio, companheirismo, carinho, e principalmente, por fazer parte da minha vida.

Ao Prof. Atlas, por ser meu orientador tanto na vida acadêmica quanto na vida pessoal e por acreditar na minha capacidade em trilhar este caminho.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, na pessoa de seu diretor Prof. Dr. Waldyr Jorge e do chefe do Departamento de Prótese Profa. Dra. Dalva Cruz Laganá.

À Comissão de Pós-graduação da FOUSP, presidida pela Profa. Dra. Marina Helena Cury Gallotini, e ao coordenador do Programa de Pós-graduação em Ciências Odontológicas, Prof. Dr. Marcelo José Strazzeri Bönecker.

À Profa. Dra. Maria Cecília Milluzi Yamada por me permitir dividir a sua sala, junto ao Prof. Atlas e a Karin; pelas conversas e ensinamentos. Admiro a sua capacidade de encarar os “obstáculos da vida” com determinação e, principalmente, alegria, de estar “na melhor idade” e continuar sendo... jovem!!

Aos professores da Disciplina de Prótese Total: Regina Tamaki, Roberto Nobuaki Yamada (obrigada pelos mimos trazidos para o nosso café da tarde!) e Vyto Kiausinis pela oportunidade de trabalhar com vocês.

À Profa. Dra. Susana Marta Isay Saad do Departamento de Tecnologia Bioquimico Farmacêutico da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pela colaboração no desenvolvimento e análises microbiológicas do queijo minas frescal.

À Karin, amiga de todas as horas, precursora no desenvolvimento dos trabalhos relacionados aos probióticos do Departamento de Prótese. Obrigada pela ajuda no desenvolvimento da minha pesquisa; pelas conversas animadas e, principalmente, por me ouvir nos momentos de stress. Admiro você por seu esforço e dedicação... afinal, conciliar a vida de mãe, professora e pesquisadora não é fácil!!

À Camila e Rose, por todos os momentos que passamos desde a época da graduação e por saber que posso contar com vocês sempre!

Ao Victor e Juliana, pela amizade e por todos os momentos em que pude contar com vocês.

Aos colegas de Disciplina de Prótese Total, Roger; Flávio; Vavá; Caju; Pri; Jun e Carol pela convivência profissional e pessoal.

A todos os colegas de Pós-graduação, em especial à Patê por todo carinho e momentos que passamos nas aulas da pós.

Aos pós-graduandos da professora Susana e funcionários do seu departamento, pela convivência; ensinamentos e presteza durante a produção e análises microbiológicas do queijo.

A todos os funcionários do Departamento de Prótese, em especial ao Luís, Nenzinha e Paula por toda ajuda e convivência ao longo desses anos.

À bibliotecária Maria Cláudia Pestana, pela atenção e orientação dada durante a construção desta tese.

Às secretárias da Pós-graduação Cátia, Alessandra e Veridiana pelos esclarecimentos prestados com relação à pós.

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

À Maria José (Diretora-chefe) da Controlbio – Assessoria Técnica Biológica Ltda e equipe: Paula, Erika e Débora.

Às empresas Danisco – Dupont e Xandô, pelo fornecimento de culturas probióticas e leite utilizados neste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a finalização deste trabalho.

"Conhecimento real é saber a extensão da própria ignorância."

Confúcio

RESUMO

Miyazima TY. Queijo minas frescal suplementado com probiótico para o controle de *Candida* sp. isolados da cavidade bucal de usuários de próteses totais - estudo duplo-cego randomizado [tese] São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2014.

Os probióticos são organismos vivos que quando ingeridos em quantidades adequadas, conferem benefícios aos indivíduos. Um destes benefícios é a capacidade de inibir o crescimento de micro-organismos patogênicos como *Candida.* Para avaliar a redução ou inibição de *Candida* isolados de usuários de próteses totais através da ingestão de probióticos, foram recrutados 135 pacientes, dos quais 59 permaneceram até o final do experimento. A ingestão dos probióticos ocorreu através da suplementação destes a queijo minas frescal. Os participantes foram pacientes usuários de próteses totais, uni ou bimaxilares, que realizam o tratamento na Faculdade de Odontologia da USP. As amostras foram coletadas através de um enxaguado bucal antes do início do experimento; 4 e 8 semanas de experimento, antes da instalação da nova prótese. Aquelas foram inoculadas em meio de cultura ágar Saubouraud dextrose com cloranfenicol, por 24-48horas, a fim de se quantificar o micro-organismo *Candida* em unidades formadoras de colônia por mililitros (UFC/mL) presentes na cavidade bucal destes pacientes. Os indivíduos que apresentaram cultura positiva ao fungo receberam embalagens com 20g de queijo minas frescal a cada 14 dias por 8 semanas consecutivas. Os participantes foram divididos em três grupos, experimental 1 e 2, e controle. Os grupos experimentais receberam os queijos suplementados com probióticos, respectivamente, *Lactobacillus acidophilus* NCFM e *Lactobacillus rhamnosus* Lr-32, e o grupo controle recebeu o queijo sem suplementação probiótica. Os queijos possuíam semelhança quanto aroma e cor. Além da quantificação de *Candida*, foram realizados testes para identificação das espécies e avaliação da atividade enzimática da fosfolipase e proteinase. Os resultados inferem que os probióticos *L. acidophilus* NCFM e *L. rhamnosus* Lr-32 suplementados em queijo minas frescal foram capazes de reduzir a prevalência de *Candida* bucal, em pacientes usuários de próteses totais, após ingestão diária dos queijos por 8 semanas consecutivas. Antes e após 8 semanas do

experimento, *Candida albicans* foi a espécie mais isolada dos pacientes nos três grupos da pesquisa. Não houve diferença significativa com relação à atividade enzimática da fosfolipase e proteinase, pelos isolados de *Candida* sp., antes e após 8 semanas de ingestão do queijo.

Palavras- chave: Probióticos. *Candida*. Prótese Total. Edentados.

ABSTRACT

Miyazima TY. Minas frescal cheese supplemented with probiotics for control of *Candida* sp. isolated from oral cavity of complete denture wearers - double-blind randomized trial [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2014. Versão original

Probiotics are living organisms which when ingested in adequate amounts confer benefits to individuals. One of these benefits is the ability to inhibit the growth of pathogenic microorganisms such as *Candida*. Reduction or inhibition of *Candida* isolated from complete denture wearers, uni or bimaxillary, was evaluated by ingestion of minas frescal cheese supplemented with probiotics. 135 patients were recruited, who 59 remained until the end of the experiment. The participants were patients in treatment at the Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. The samples were collected through a rinsed mouthwash at the base line, 4 and 8 weeks of experiment, before the installation of the new prosthesis. The samples were seeded on Saubouraud agar dextrose with chloramphenicol plates, incubated for 24-48 hours, in order to quantify in colony-forming units per milliliter (CFU/mL) of *Candida* presents in the oral cavity of these patients. Subjects who presented fungus positive culture received packages containing 20g of minas frescal cheese every 14 days for 8 consecutive weeks. The participants were divided into three groups: two experimental and one control. The experimental groups received the cheeses supplemented with probiotics *Lactobacillus acidophilus* NCFM and *Lactobacillus rhamnosus* Lr-32. The control group received the cheese without probiotic supplementation. The cheeses had similarity as flavoring and coloring. In addition to the quantification of *Candida*, tests for species identification, phospholipase and proteinase activities were carried out. The results infer that probiotics *L. acidophilus* NCFM and *L. rhamnosus* Lr-32 supplemented in minas frescal cheese were able to reduce the prevalence of oral *Candida* in patients complete denture wearers, after daily intake of cheeses for 8 consecutive weeks. At baseline and after 8 weeks of the experiment *Candida albicans* was the most frequently isolated from denture wearers in all groups. Furthermore, no significant

difference was observed in the phospholipase and proteinase activities by isolates of *Candida* sp., before and after 8 weeks of ingestion of cheese.

Keywords: Probiotics. *Candida*. Complete Denture. Edentulous.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 4.1 - Fluxograma da distribuição dos sujeitos da pesquisa 36

Figura 4.2 - Caixa de isopor para transporte da embalagem com queijo 38

Figura 4.3 - Caixa de isopor contendo embalagem com queijo e gelo picado 38

Figura 4.4 - *L. acidophilus* ou *L. rhamnosus* diluídos em água peptonada 40

Figura 4.5 - Diluição seriada 40

Figura 4.6 - Inóculo em placa de Petri 41

Figura 4.7 - Colocação do meio fundido 41

Figura 4.8 - Fluxograma da amostragem e análises microbiológicas dos queijos minas frescal 42

Figura 4.9 - Pesagem da amostra 43

Figura 4.10-Homogeneização no Bag Mixer 43

Figura 4.11-Amostra em água peptonada (diluição 1g queijo:9ml de água) 44

Figura 4.12-Tranferência de 1ml para realização da diluição seriada 44

Figura 4.13-Diluição seriada 44

Figura 4.14-Inóculo em placa de Petri 44

Figura 4.15-Colocação do meio fundido 45

Figura 4.16-Seta indica a morfologia da colônia de *L. acidophilus* NCFM 45

Figura 4.17-Seta indica a morfologia da colônia de *L. rhamnosus* Lr-32 45

Figura 4.18-Populações de *L. acidophilus* NCFM (média) obtidas para os queijos produzidos com a suplementação do mesmo, após 1, 7 e 14 dias de armazenamento refrigerado a 5±1°C. La- corresponde à viabilidade testada de *L. acidophilus* NCFM informada pelo fabricante..... 46

Figura 4.19-Populações de *L. rhamnosus* Lr-32 (média) obtidas para os queijos produzidos com a suplementação do mesmo, após 1, 7 e 14 dias de armazenamento refrigerado a 5±1°C. Lr- corresponde à viabilidade testada de *L. rhamnosus* Lr-32 informada pelo fabricante. Queijos Q1-Q6 correspondem àqueles produzidos inicialmente com 2,5 gramas de *L. rhamnosus* Lr-32 liofilizado. Queijos Q7- Q14 correspondem àqueles produzidos com 3,5 gramas de *L. rhamnosus* Lr-32 liofilizado. 47

Figura 4.20-Diluição seriada..... 48

Figura 4.21-Placa Petrifilm™ EC 48

Figura 4.22-Inóculo em placa 48

Figura 4.23-Assentamento da película plástica..... 48

Figura 4.24-Sem crescimento 49

Figura 4.25-Contagem de *E. coli* = 0, contagem de coliformes totais = 6 49

Figura 4.26-Contagem de *E. coli* = 1, contagem de coliformes totais = 2 50

Figura 4.27-Protocolo de produção do queijo minas frescal A, B e C 51

Figura 4.28-Aquecimento do leite (com ácido lático) a 37°C..... 52

Figura 4.29-Adição de cloreto de cálcio 52

Figura 4.30-Adição de coagulante 53

Figura 4.31-Adição da cultura probiótica no queijo A ou B 53

Figura 4.32-Coagulação do leite a 36°C por pelo menos 50 minutos 53

Figura 4.33-Teste da faca 53

Figura 4.34-Corte da coalhada 53

Figura 4.35-Dessoragem parcial 54

Figura 4.36-Salga 54

Figura 4.37-Homogeneização 54

Figura 4.38-Enformagem 56

Figura 4.39-Enformagem e estocagem sob refrigeração a 5°C 54

Figura 4.40-Viragens para dessoragem completa 55

Figura 4.41-Enxaguado bucal 57

Figura 4.42-Centrífugação das amostras coletadas 57

Figura 4.43-Diluição seriada 58

Figura 4.44-Inóculo em placa 58

Figura 4.45-Colônias de *Candida* sp. 58

Figura 4.46-Colônias verdes 60

Figura 4.47-Colônias lilás 60

Figura 4.48-Colônias azuis 60

Figura 4.49-Colônias rosas esbranquiçadas 60

Figura 4.50-Colônias creme 60

Figura 4.51-Colônias azuis metálicas 60

Figura 4.52-Tubo germinativo positivo-blastoconídeo (seta 1) de levedura emergindo um tubo germinativo (seta 2), Tubo germinativo negativo-blastoconídeo (seta 1) de levedura emergindo uma pseudo-hifa (seta 3) 62

Figura 4.53-Clamidoconídeo 63

Figura 4.54-Setas indicam a formação de gás 65

Figura 4.55-Seta indica o não crescimento em meio Sabouraud dextrose a 45°C .. 66

Figura 4.56-Seta indica o não crescimento em caldo Sabouraud hipertônico 67

Figura 4.57-Galeria contendo cúpulas com meio C e seus respectivos açúcares 69

Figura 4.58-Setas indicam cúpulas em que ocorreram a assimilação do açúcar pela levedura. Cúpula 0 representa o parâmetro para comparação 70

Figura 4.59-P_Z = d/D (diâmetro da colônia/ diâmetro da zona de precipitação) 72

Figura 4.60-PR_Z = d/D (diâmetro da colônia/ diâmetro da zona de precipitação) 74

Figura 5.1 - Prevalência de pacientes que apresentaram colonização por uma única espécie ou por 2 espécies diferentes de *Candida*, de acordo com os três grupos, antes do início do experimento (t_0) 81

Figura 5.2 - Prevalência das espécies de *Candida* identificadas nos três grupos da pesquisa: 20 espécies no grupo experimental 1, 21 espécies no grupo experimental 2 e 22 espécies no grupo controle, totalizando 63 espécies de *Candida*, antes do início do experimento (t_0) 82

Figura 5.3 - Prevalência global das espécies de *Candida*, antes do início do experimento (t_0) 83

Figura 5.4 - Redução da enumeração das UFCs de *Candida* sp. nos três grupos do experimento após ingestão diária dos queijos por 8 semanas (t_f) 88

Figura 5.5 - Prevalência de pacientes que apresentaram colonização por uma única espécie ou por 2 espécies diferentes de *Candida*, de acordo com os grupos, após 8 semanas do experimento (t_f) 91

Figura 5.6 - Prevalência das espécies de *Candida* identificadas de acordo com os grupos da pesquisa: 18 espécies em cada grupo, totalizando 54 espécies de *Candida*, após 8 semanas do experimento (t_f) 92

Figura 5.7 - Prevalência global das espécies de *Candida*, após 8 semanas do experimento (t_f) 93

Figura 5.8 - Redução dos índices PZ de fosfolipase produzidos pelos isolados de *Candida* sp. nos três grupos do experimento após ingestão diária dos queijos por 8 semanas (t_f) 97

Figura 5.9 - Redução dos índices PR Z de proteinase produzidos pelos isolados de *Candida* sp. nos três grupos do experimento após ingestão diária dos queijos por 8 semanas (t_f) 100

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 - Características demográficas e clínicas das variáveis qualitativas dos pacientes de acordo com os grupos 78

Tabela 5.2 - Características demográficas e clínicas das variáveis quantitativas dos pacientes de acordo com os grupos 79

Tabela 5.3 - Populações de *Candida* sp. nas amostras bucais coletas de pacientes pertencentes aos grupos da pesquisa, antes do início do experimento (t_0) 80

Tabela 5.4 - Valores quantitativos da produção de exoenzimas, fosfolipase e proteinase, produzidas pelos isolados de *Candida* sp., de acordo com os grupos, antes do início do experimento (t_0) 83

Tabela 5.5 - Número de pessoas colonizadas por espécies de *Candida* que apresentaram atividade de produção de fosfolipase, de acordo com cada grupo, antes do início do experimento (t_0)..... 84

Tabela 5.6 - Número de pessoas colonizadas por espécies de *Candida* que produzem e não produzem fosfolipase, de acordo com os grupos da pesquisa, antes do início do experimento (t_0) 85

Tabela 5.7 - Número de pessoas colonizadas por espécies de *Candida* que apresentaram atividade de produção de proteinase, de acordo com cada grupo, antes do início do experimento (t_0) 86

Tabela 5.8 - Número de pessoas colonizadas por espécies de *Candida* que produzem e não produzem proteinase, de acordo com os grupos da pesquisa, antes do início do experimento (t_0) 87

Tabela 5.9 - Populações de *Candida* sp. nas amostras bucais coletas de pacientes pertencentes aos grupos da pesquisa, após 8 semanas de ingestão do queijo minas frescal (t_f) 89

Tabela 5.10- Presença e ausência de isolados de *Candida* sp. nas amostras coletadas dos pacientes após 8 semanas de ingestão do queijo minas frescal (t_f), de acordo com os grupos da pesquisa 90

Tabela 5.11- Valores quantitativos da fosfolipase e proteinase, produzidas pelos isolados de *Candida* sp., de acordo com cada grupo, após 8 semanas de ingestão do queijo minas frescal pelos participantes da pesquisa (t_f) 94

Tabela 5.12-Número de pessoas colonizadas por espécies de *Candida* que apresentaram atividade de produção de fosfolipase, de acordo com cada grupo, após 8 semanas de ingestâo do queijo minas frescal (tf) 95

Tabela 5.13-Número de pessoas colonizadas por espécies de *Candida* que produzem e não produzem fosfolipase, de acordo com cada grupo, após 8 semanas de ingestão do queijo minas frescal pelos participantes da pesquisa (t_f) 96

Tabela 5.14- Número de pessoas colonizadas por espécies de *Candida* que apresentaram atividade de produção de proteinase, de acordo com cada grupo, após 8 semanas de ingestão do queijo minas frescal (t_f) 98

Tabela 5.15- Número de pessoas colonizadas por espécies de *Candida* que produzem e não produzem proteinase, de acordo com cada grupo, após 8 semanas de ingestão do queijo minas frescal (t_f) 99

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASD	Ágar Sabourarud Dextrose
ATCC	*American Type Culture Collection*
B.	*Bidobacterium*
C.	*Candida*
$CaCl_2$	cloreto de cálcio
cm^3	centímetro cúbico
et al.	e colaboradores
FAO/WHO	*Food and Agriculture Organization of the United Nations/ Worlh Health Organization*
g	grama
g	força G
HCl	ácido clorídrico
IFN-γ	interferon gama
IL-4	interleucina 4
K_2PO_4	fosfato de potássio
l	litro
L.	*Lactobacillus*
M	molar
$MgSO_4$. $7H_2O$	sulfato de magnésio heptahidratado
ml	mililitros
mm	milímetro
MRS	*DeMan- Rogosa- Sharpe*
NaCl	cloreto de sódio
pH	potencial hidrogeniônico
RNAm	RNA mensageiro
S.	*Streptococcus*
sp.	espécie
spp.	espécies
UFC	unidade formadora de colônia

LISTA DE SÍMBOLOS

µ	micrômetro
%	porcento
±	mais ou menos
°C	graus Celsius
™	*trade mark*
®	*registered sign*
µL	microlitro
=	igual
≤	menor ou igual
<	menor
χ^2	chi quadrado
>	maior
*	asterisco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 20
2 REVISÃO DA LITERATURA 23
2.1 *CANDIDA* E MICROBIOTA BUCAL 23
2.2 FATORES PREDISPONENTES DO HOSPEDEIRO 23
2.2.1 Idade 24
2.2.2 Uso de próteses 24
2.2.3 Diabetes *mellitus* 25
2.2.4 Higiene bucal 26
2.3 FATORES DE VIRULÊNCIA EXPRESSOS POR *CANDIDA* SP. 26
2.3.1 Fosfolipase 26
2.3.2 Proteinase 27
2.4 PROBIÓTICOS 28
2.4.1 Probióticos e cavidade bucal 29
2.4.2 Probióticos e *Candida* sp. bucal 31
3 PROPOSIÇÃO 34
3.1 OBJETIVO GERAL 34
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 34
4 MATERIAL E MÉTODOS 35
4.1 TIPO DE ESTUDO 35
4.2 SUJEITOS DA PESQUISA 35
4.2.1 Critérios de inclusão 37
4.2.2 Critérios de exclusão 37
4.3 PROTOCOLO DE ESTUDO E INTERVENÇÃO 38
4.4 GRUPOS DA PESQUISA 39
4.4.1 Estudo piloto para produção do queijo minas frescal 39
4.4.1.1 Padronização da quantidade de *Lactobacillus* sp. utilizada para produção dos queijos dos grupos experimentais 40
4.4.1.2 Amostragem e análise microbiológica dos queijos 42
4.4.1.2.1 Monitoramento das bactérias probióticas: L. acidophilus NCFM e L. rhamnosus Lr-32 42
4.4.1.2.1.1 *L. acidophilus* NCFM 42

4.4.1.2.1.2 *L. rhamnosus* Lr-32 43
4.4.1.2.2 Monitoramento das bactérias indicadores de contaminação: coliformes totais e Escherichia coli..... 47
4.4.2 Produção do queijo minas frescal 50
4.5 COLETA DAS AMOSTRAS BUCAIS 55
4.5.1 Escolha da metodologia de coleta..... 55
4.5.2 Quantificação de *Candida* sp. 56
4.5.3 Identificação das espécies de *Candida* 59
4.5.3.1 CHROMagar *Candida*®..... 59
4.5.3.2 Prova do tubo germinativo..... 61
4.5.3.3 Prova do microcultivo em lâmina..... 62
4.5.3.4 Fermentação de carboidratos..... 64
4.5.3.5 Diferenciação entre as espécies *C. albicans* e *C. dubliniensis*..... 65
4.5.3.5.1 Teste de temperatura a 45°C 65
4.5.3.5.2 Teste de tolerância em caldo Sabouraud hipertônico..... 67
4.5.3.6 Sistema de identificação Api20® C Aux 68
4.5.4 Avaliação das atividades enzimáticas..... 70
4.5.4.1 Preparo dos inóculos padrões de *Candida* sp., experimentos e controle, para os testes das atividades da fosfolipase e da proteinase..... 71
4.5.4.2 Determinação da atividade da fosfolipase..... 71
4.5.4.3 Determinação da atividade da proteinase 73
4.6 VARIÁVEIS DO ESTUDO 74
4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS 75
5 RESULTADOS..... 77
5.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS DOS GRUPOS..... 77
5.2 DESCRIÇÃO E PREVALÊNCIA DE *CANDIDA* SP. NAS AMOSTRAS COLETADAS DOS PACIENTES ANTES DO INÍCIO DO EXPERIMENTO (t_0) 79
5.3 DESCRIÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA FOSFOLIPASE E PROTEINASE NAS AMOSTRAS COLETADAS DOS PACIENTES ANTES DO INÍCIO DO EXPERIMENTO (t_0) 83
5.3.1 Atividade da fosfolipase 84
5.3.2 Atividade da proteinase..... 86
5.4 REDUÇÃO DE *CANDIDA* SP. NAS AMOSTRAS COLETADAS APÓS A INGESTÃO DOS QUEIJOS (t_f).....87

5.5 DESCRIÇÃO E PREVALÊNCIA DE *CANDIDA* SP. NAS AMOSTRAS COLETADAS DOS PACIENTES APÓS 8 SEMANAS DE INGESTÃO DIÁRIA DO QUEIJO MINAS FRESCAL (t_f).....88
5.6 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS ISOLADOS DE *CANDIDA* SP. APÓS O EXPERIMENTO (t_f) 93
5.6.1 Atividade da fosfolipase 94
5.6.2 Atividade da proteinase 97
6 DISCUSSÃO 101
6.1 DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE UFCS DE *CANDIDA* A PARTIR DAS AMOSTRAS BUCAIS..... 101
6.2 REDUÇÃO DE *CANDIDA* APÓS O CONSUMO DO QUEIJO MINAS FRESCAL SUPLEMENTADO COM PROBIÓTICOS 102
6.3 PREVALÊNCIA DE *CANDIDA* SP. EM USUÁRIOS DE PRÓTESES TOTAIS 103
6.4 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS POR *CANDIDA* 105
7 CONCLUSÕES 107
REFERÊNCIAS..... 108
ANEXOS 123

1 INTRODUÇÃO

Os fungos pertencentes ao gênero *Candida* são encontrados em diversos ecossistemas, inclusive como organismos comensais, comuns da microbiota de hospedeiros humanos e animais; entretanto, dependendo dos fatores predisponentes do hospedeiro comportam-se como patógenos oportunistas podendo causar desde infecções superficiais de pele e mucosas, até disseminações sistêmicas graves e invasivas (1-3).

Candida é um fungo que possui característica conhecida como dimorfismo fúngico, isto é, assume a morfologia de hifa e/ou levedura. Durante a sua vida vegetativa, quando os ciclos biológicos de nutrição e reprodução encontram-se ativos, podem apresentar uma forma filamentosa verdadeira em que as hifas podem estender-se a algumas centenas de micrômetros sendo compostas por longas ramificações, septadas ou filamentosas. Enquanto que na forma de levedura, pode medir de 2 a 8µ por 3 a 14µ, e tendo a forma esférica ou ovóide. Esse dimorfismo é relevante para a patogenicidade do micro-organismo, assim como para os problemas clínicos de diagnóstico e tratamento da doença relacionada (4-6).

Entre 66 a 80% das infecções fúngicas são acometidas por candidíase ou candidose, isto é, infecções superficiais ou invasivas causadas por micro-organismos oportunistas do gênero *Candida* (7, 8).

A candidose bucal enquadra-se no grupo da candidíase cutâneo-mucosa. Os achados clínicos são bastante variáveis, e suas manifestações clínicas podem apresentar-se como: pseudomembranosa, caracterizada pela presença de placas esbranquiçadas que cedem à raspagem, onde abaixo dela a mucosa apresenta-se eritematosa; atrófica aguda, sendo esta uma lesão secundária a um quadro de candidíase pseudomembranosa, e caracterizada por eritema visível no dorso da língua ou, primariamente, observada em outras regiões da boca e associada à antibioticoterapia prévia; hiperplásica crônica, conhecida como candidíase leucoplásica, caracterizada pelo aparecimento de placas brancas com contorno eritematoso, e que estão fortemente aderidas à mucosa jugal, lábios e língua, e a queilite angular que pode ter como um de seus agentes etiológicos *Candida* sp., caracterizada por lesão no ângulo de

junção do lábio superior com o inferior, e apresenta uma crosta que sangra facilmente (3, 9).

Fatores locais e sistêmicos podem predispor o desenvolvimento da doença, como por exemplo, idade avançada; uso de próteses dentárias, mudança do pH da cavidade bucal, higiene bucal insatisfatória, redução do fluxo salivar, dieta rica em carboidratos, deficiência nutricional; uso prolongado de antibióticos, terapia hormonal, sistema imunológico deficiente, como em pacientes HIV positivo, doenças crônicas ou diabetes *mellitus* (3, 10-13).

Mais de duzentas espécies de *Candida* já foram descritas, mas somente 10% estão relacionadas a doenças nos seres humanos (14). As espécies mais comuns são *C. albicans, C. tropicalis, C. glabrata, C. pseudotropicalis, C. guilliermondii, C. krusei* (5, 15), *C. lusitaniae, C.parapsilosis e C. stellatoidea* (15). Com o aparecimento da AIDS, uma nova espécie do gênero *Candida* tem sido descrita como *C. dubliniensis*, com aspectos similares a *C. albicans* (14, 16, 17).

A emergência de espécies como *C. glabrata*, antes considerada não patogênica e hoje patogênica, tem sido associada a sua resistência aos antifúngicos usados comumentemente (18, 19).

Existem fatores de virulência associada a *Candida* que contribuem para a patogenicidade da candidose bucal, como por exemplo, adesão aos receptores e adesinas da superfície mucosa (20); formação de hifas (21, 22), e a produção de enzimas hidrolíticas, como proteinase e fosfolipase (23, 24).

A forma tradicional de tratamento para a candidíase bucal é o uso de antifúngicos derivados poliênicos e azólicos (25, 26). Para o tratamento da candidíase bucal, provocada pela *C. albicans*, é muito utilizada a nistatina como fármaco tópico. Administra-se 2 ou 3 ml de uma solução contendo 100.000 unidades/ml de nistatina e pede-se ao paciente que faça bochecho com a solução por pelo menos cinco minutos antes de sua deglutição, a cada 6 horas, durante pelo menos 10 dias ou 48 horas após a remissão dos sintomas. Em usuários de próteses totais, pode-se recomendar a aplicação tópica da pomada de nistatina (100.000 unidades/ml) a cada 6 horas à superfície da base que fica em contato com a mucosa. Apesar de serem tratamentos comprovadamente eficientes e seguros, existe a possibilidade de efeitos colaterais que devem ser considerados, como por exemplo, distúrbios

gastrointestinais leves e transitórios, como náuseas, vômito e diarréia, após ingestão oral (27), assim como a resistência do fungo frente a esses medicamentos (28, 29). Por estes motivos, o uso de substâncias naturais, como agente profilático antifúngico, é um assunto que merece mais atenção.

Os probióticos são micro-organismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (30). As principais bactérias consideradas probióticas são as pertencentes do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, e usualmente são empregadas como suplementos em alimentos, como por exemplo, em alimentos lácteos (31-35).

As bactérias probióticas têm a capacidade de modificar o equilíbrio microbiológico do hospedeiro e reduzir o crescimento de patógenos, como as espécies de *Candida* (36). Na cavidade oral de camundongos, *Lactobacillus acidophilus* reduzem o número de células de *Candida*, possivelmente pela indução da produção de IL-4 e IFN-γ nos nódulos linfáticos e óxido nítrico na saliva (37). *In vitro*, *Lactobacillus* sp. também podem aderir-se ao epitélio da mucosa, competindo deste modo pelos sítios de adesão (38), além de produzirem diferentes metabólitos, como peróxido de hidrogênio (38), e peptídeos cíclicos antifúngicos (39), no qual inibem o crescimento de *Candida*. Devido a essa capacidade dos probióticos em inibir o crescimento de *Candida*, a utilização das mesmas podem contribuir de modo profilático ou terapêutico para a não manifestação de candidíase bucal em usuários de próteses totais.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *CANDIDA* E MICROBIOTA BUCAL

A microbiota da cavidade bucal pode ser composta por diferentes leveduras sendo a mais comum as do gênero *Candida* (2, 40-44). Leveduras como *Clodosporium* (2), *Saccharomyces cerevisiae* (2, 42-45) e *Rhodotorula glutinis* (42) podem ser isoladas da cavidade bucal de indivíduos saudáveis, sem causar infecções.

Leveduras do gênero *Candida* podem ser encontradas em aproximadamente 25 a 50% dos indivíduos saudáveis (14), como um organismo comensal, não causando danos aparentes nem induzindo inflamação nos tecidos adjacentes (14, 15, 46). Essa prevalência varia de acordo com a população observada e com a sensibilidade da técnica utilizada para coleta das amostras (47-51).

Dentre as espécies de *Candida,* a que possui maior frequência de isolamento em amostras da cavidade bucal é de *C. albicans* (41, 42, 44, 45, 52, 53). Outras espécies como *C. glabrata* (19, 40-45, 52, 53); *C. tropicalis* (40-43, 45, 52-54); *C.parapsilosis* (41-44, 53); *C. kefyr* (42, 45); *C. famata* (42, 43); *C. dubliniensis* (42, 53), e *C. krusei* (41, 42, 53) têm sido isoladas de amostras bucais tanto de indivíduos saudáveis como os que apresentam candidose bucal.

A presença de *Candida* na cavidade bucal não resulta, necessariamente em infecções, a menos que existam fatores que predisponham ao desenvolvimento da doença (2, 3, 55, 56).

2.2 FATORES PREDISPONENTES DO HOSPEDEIRO

Em indivíduos saudáveis, infecções por *Candida* são suprimidas por mecanismos de defesa específicos e não-específicos da saliva e da mucosa, além da competição por sítios de ligação por outros micro-organismos da

microbiota bucal (57). A seguir, serão abordados os fatores mais comuns que predispões os indivíduos à manifestação da candidose.

2.2.1 Idade

Os extremos da idade, isto é, crianças e idosos estão propensos a manifestarem a candidose bucal, pois nas crianças a composição da microbiota normal ou indígena ainda está em formação, e nos idosos ocorrem alterações no sistema imunológico produzidas ao longo do processo de envelhecimento, conhecidas pelo termo imunossenescência (58-60).

A idade avançada pode representar um fator predisponente para o aumento de infecções por *Candida* (61-63) devido à diminuição da imunidade mediada por células do sistema imunológico (64) e diminuição do fluxo salivar (65). Além de outros fatores associados que serão expostos a seguir.

2.2.2 Uso de próteses

Usuários de próteses dentárias possuem maior predisposição ao desenvolvimento de candidose bucal (66) e apresentam índices maiores de prevalência de *Candida* sp. (41, 67) se comparado àqueles que não fazem uso de aparelhos protéticos.

O material utilizado para a confecção da base das próteses permite criar condições favoráveis para a adesão e desenvolvimento de *Candida* sp. (68, 69). A higienização deficiente tanto da boca quanto das próteses favorece a formação de biofilme de *Candida,* que pode atuar como um reservatório do micro-organismo para o desenvolvimento de infecções (70-73).

Pacientes usuários de próteses totais ou parciais removíveis podem apresentar uma patologia conhecida como estomatite sob prótese ou estomatite protética caracterizando-se por uma inflamação eritematosa da área da mucosa bucal que fica coberta pela prótese. Na maioria dos casos a doença

é assintomática e as poucas pessoas que possuem sintomatologia relatam sensação de queimação, desconforto e dor, além dos sinais de inflamação observados na mucosa bucal. A etiologia da doença ainda não está completamente elucidada. O surgimento da estomatite sob prótese vem sendo associado principalmente ao trauma ocasionado pela má adaptação da prótese (74); às infecções por *Candida*, principalmente *C. albicans* (47, 75, 76), e à má higiene bucal (77, 78), entretanto nenhuma comprovação de relação causa-efeito foi demonstrada. Entende-se que sua ocorrência seja multifatorial (79).

A presença de *Candida* sp. na cavidade bucal de usuários de próteses assintomáticos pode ser associada à algumas condições sitêmicas, como diabetes *mellitus*, e à deficiência na higiene desses indivíduos.

2.2.3 Diabetes *mellitus*

A predisposição dos diabéticos às infecções fúngicas tem sido associada aos altos níveis de glicose nos fluidos teciduais. Além disso, a presença de altas concentrações de glicose na saliva combinada à diminuição do fluxo salivar pode facilitar o crescimento dos fungos e aumentar a sua adesão às células epiteliais da mucosa bucal (80, 81). Consequentemente, as células bucais de pacientes diabéticos apresentam maior adesão de *Candida* quando comparada às células de indivíduos não-diabéticos (82).

A utilização de próteses por pacientes diabéticos associado aos fatores que alterem a mucosa bucal pemitem que esses pacientes tenham maior propensão a desenvolver infecções fúngicas, principalmente por *C. albicans* (83, 84). Essas alterações podem ocorrer devido à má adaptação das próteses as quais podem ocasionar lesões na mucosa que permitem uma maior permeabilidade das toxinas e antígenos fúngicos para o epitélio (64).

2.2.4 Higiene bucal

Os usuários de próteses de uma maneira geral, perderam seus dentes por falta de cuidados com a higiene, doença periodontal ou trauma, e não possuem uma higiene oral satisfatória (85). Entretanto, observa-se a dificuldade de se conseguir mensurar a higiene de um indivíduo. Desta forma, existe controvérsia com relação à associação da higiene insatisfatória com a presença ou não de *Candida* ou candidose (86-89), contudo, faz-se necessário orientar os pacientes quanto à necessidade de uma higiene satisfatória.

2.3 FATORES DE VIRULÊNCIA EXPRESSOS POR *CANDIDA* SP.

Fatores de virulência são mecanismos que os micro-organismos apresentam para contribuir para a patogenicidade da doença. Os principais fatores de virulência associado a *Candida* são produção de enzimas hidrolíticas, capacidade de adesão à superfície celular, formação de hifas e mudança fenotípica (90, 91). Essas enzimas hidrolíticas facilitam a adesão e a invasão do micro-organismo nos tecidos (92) e parece possuir um papel importante para a proliferação de *Candida* (93). As principais enzimas produzidas por *C. albicans* são as fosfolipases e as proteinases.

2.3.1 Fosfolipase

As fosfolipases constituem uma variedade de enzimas capazes de hidrolisar ligações ésteres de fosfolipídeos, sendo este um mecanismo de invasão e lesão celular, pois ocorre quebra dos lipídeos constituintes da membrana das células (94). Já foram identificados 7 genes para as fosfolipases, entretanto somente 4 delas têm sido bem caracterizadas (95).

Entretanto, mais estudos precisam ser feitos para se elucidar o papel dessa enzima na patogenicidade da doença.

Em estudos conduzidos com usuários de protéses com e sem candidose, verificou-se que os isolados de *Candida,* de ambos os grupos, apresentaram atividade de produção de fosfolipase sem diferença entre si (96-98), assim como em estudo conduzido com pacientes usuários de prótese diabéticos e não-diabéticos (92). Entretanto, em estudo com modelo animal com candidose sistêmica, os autores associaram os altos níveis de produção de fosfolipase pelos isolados de *C. albicans* com a alta virulência da doença (99).

2.3.2 Proteinase

As proteinases são enzimas relacionadas com a atividade hidrolítica e a adesão às células da mucosa (24, 92, 97), sendo que a secreção e a atividade destas enzimas variam conforme as condições hospedeiro como pH da saliva; fluxo salivar (100), além dos nutrientes disponíveis, concentração de substratos (101), e conforme a morfologia celular fúngica, isto é, sob forma de hifa ou levedura, pois essa condição está relacionada com o desenvolvimento do biofilme de *C. albicans* (24, 102).

Em estudo com pacientes diabéticos e não-diabéticos, observou-se que a produção de proteinase dos isolados de *C. albicans* foi maior nos pacientes diabéticos do que no grupo controle, indicando que em diferentes grupos de pacientes observa-se um comportamento diferente com relação à produção da exoenzima (92, 103). Além disso, em estudo com pacientes usuários de próteses com e sem candidose, verificou-se que a atividade de produção de proteinase expressa pelos isolados de *C. albicans* nos pacientes sintomáticos foi significantemente maior do que no grupo controle, indicando que possa haver um importante papel desta enzima no desenvolvimento da doença (96, 104).

2.4 PROBIÓTICOS

Os probióticos começaram a ser pesquisados devido à sua capacidade de prevenir doenças e fortalecer o sistema imunológico dos indivíduos, ou seja, acreditando-se na reação de defesa do próprio organismo, uma vez que eles fazem parte da microbiota indígena de pessoas saudáveis. Os possíveis mecanismo de ação podem estar relacionados à produção de substâncias anti-microbianas (105-108) e à modulação do sistema imunológico intestinal e sistêmico, tais como aumento da responsividade de imunoglobulinas A (109, 110), aumentar a atividade de fagócitos (111) e supressão da proliferação de linfócitos e da produção de citocinas inflamatórias por células T (112-114), entretanto, mais pesquisas devem ser conduzidas para esclarecer esses mecanismos.

Segundo a definição da FAO/WHO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations/ Worlh Health Organization*), os probióticos são micro-organismos vivos que conferem benefícios aos indivíduos quando administrados em quantidades adequadas (30). Por este motivo os probióticos usualmente são suplementados aos alimentos, como por exemplo, em goma de mascar (115, 116); queijo (117-119); e leites (120-122), mas o seu uso não está restrito somente aos alimentos, podem ser utilizados na forma de compostos farmacêuticos ou agentes tópicos, como por exemplo, tabletes (123, 124) ou pastilhas (125, 126). No Brasil, a ANVISA determina que a dose diária da cultura probiótica deve corresponder de 10^8 a 10^9 unidades formadoras de colônia (UFC) na porção diária do alimento (127).

A seleção de bactérias probióticas tem como base os seguintes critérios preferenciais: o gênero ao qual pertence; ser de origem humana; ser estável frente ao ácido e a bile; ter a capacidade de aderir-se à mucosa intestinal e colonizá-la, ao menos temporariamente; ter a capacidade de produzir compostos antimicrobianos e ser metabolicamente ativo no intestino. Outros critérios fundamentais são: a segurança para uso humano; o histórico de não patogenicidade e não estarem associadas a outras doenças, tais como endocardite; além da ausência de genes determinantes da resistência aos antibióticos (128-131). Além disso, os probióticos devem, necessariamente, resultar em efeitos benéficos mensuráveis sobre a saúde, substanciados por

estudos conduzidos no hospedeiro a qual ele se destina, ou seja, os probióticos destinados para o uso em humanos requerem comprovação da eficácia através de ensaios clínicos (132, 133). Desta forma, para se garantir os critérios citados anteriormente, convém utilizar culturas probióticas comerciais que possuam registros que as classificam como cepas probióticas (133).

Os principais micro-organismos utilizados como probióticos incluem bactérias dos gêneros *Lactobacillus* sp. e *Bifidobacterium* sp., por fazerem parte da microbiota intestinal de indivíduos saudáveis (60, 133, 134).

Na área médica, são observados estudos utilizando probióticos para: o tratamento/ prevenção de infecções urogenitais, através da combinação de *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14, mostrando-se promissoras na restauração e manutenção de uma microbiota vaginal saudável (135, 136); para o tratamento/ prevenção de infecções fúngicas ginecológicas (137-140); uso profilático na prevenção de distúrbios gastrointestinais em recém-nascidos, como a diarreia aguda (141-144); para o aumento no estímulo do sistema imunológico em idosos (119, 120, 122, 145, 146); para a melhora no trânsito intestinal, através da diminuição do tempo total do trânsito alimentar em adultos (147) e melhora nos sintomas de constipação em crianças (148), e também na remissão de doenças inflamatórias intestinais, como a colite ulcerativa (149-151).

2.4.1 Probióticos e cavidade bucal

Na área odontológica, poucos são os estudos que observaram a interação de cepas probióticas com micro-organismos patogênicos da cavidade bucal. A maioria dos estudos clínicos está voltada para a prevenção/ tratamento de doenças periodontais ou da doença cárie, poucos são aqueles para as infecções fúngicas.

Com relação à doença periodontal, podemos citar o estudo de Krasse et al. (152) que observaram a redução no sangramento gengival e diminuição do índice de placa bacteriana em pacientes com gengivite moderada e severa,

após a utilização de formulação probiótica contendo *Lactobacillus reuteri*, associando a melhora à normalização da microbiota dos pacientes.

Shimauchi et al. (123) avaliaram o efeito da cepa *L. salivarius* WB21 sob o tecido periodontal e a expressão de marcadores de inflamação na saliva por 8 semanas, e observaram uma diminuição no índice de placa, na profundidade clínica de sondagem, e dos níveis de mediadores da inflamação na saliva dos pacientes fumantes do grupo que ingeriu a formulação contendo os probióticos.

Twetman et al. (116) verificaram que a utilização de goma de mascar contendo *L. reuteri* ATCC 55730 e ATCC PTA 5289 ao longo de 4 semanas por pacientes com doença periodontal apresentaram redução no índice de sangramento a sondagem e nos níveis de mediadores inflamatórios do fluido gengival crevicular, com diferença estatística dos grupos experimentais com relação ao grupo controle.

Para a doença cárie observa-se que a maioria dos estudos objetiva reduzir os níveis de *S. mutans* da cavidade bucal, pois esta bactéria é considerada o agente etiológico primário devido ao seu grande potencial cariogênico.

Em estudo de Çaglar et al. (125) verificaram uma redução dos níveis de *S. mutans* da saliva após a utilização de produtos contendo *L. reuteri* ATCC 55730 por adultos durante 3 semanas.

Em outro estudo de Çaglar et al. (115), os pacientes foram divididos em quatro grupos: o grupo A consumiu goma de mascar contendo somente probióticos (*L. reuteri* ATCC 55730 e *L. reuteri* ATCC PTA5289), o grupo B consumiu goma contendo somente xylitol, o grupo C consumiu gomas contendo xylitol e probióticos, e o grupo D consumiu goma de mascar sem xylitol e probióticos por 3 semanas. Os autores sugeriram que o consumo de goma de mascar, por 3 semanas, contendo probióticos ou xylitol podem reduzir os níveis de *S. mutans* da saliva, entretanto, a combinação desses dois agentes (probióticos e xylitol) parece não ser efetivo.

Por fim, em 2008, Çaglar et al. (126) realizaram outro estudo duplo-cego randomizado, na qual os pacientes apresentavam alto risco de desenvolver cárie, e foram divididos em grupo experimental e controle. O grupo experimental utilizou um dispositivo contendo *L. reuteri* ATCC 55730 e *L.*

reuteri ATCC PTA5289 por 10 dias e, observaram significante redução nos níveis de *S. mutans* da saliva deste grupo.

2.4.2 Probióticos e *Candida* sp. bucal

Como dito anteriormente, pouco são os estudo que utilizam os probióticos para prevenção/ tratamento de infecções fúngicais bucais. Desta forma, os mecanismos de ação envolvidos no controle dos níveis de *Candida* sp. ainda não são claros.

Wagner et al. (153) realizaram uma pesquisa para comparar duas espécies de *Bifidobacterium* (*B. infantis e B. lactis*) com relação às suas capacidades de proteger camundongos imunodeficientes de candidíase orogástrica letal, e observaram que as bifidobacterias afetam a produção de anticorpos contra *C. albicans;* inibem a disseminação da candidíase; suprimem a perda de peso associada com infecção pelo fungo analisado; inibem o crescimento de *C. albicans* no trato alimentar; inibem a candidíase sistêmica de origem endógena, e reduzem a severidade da candidíase gástrica em ambos os tipos de camundongos. Foi verificado que *B. infantis* inibem candidíase sistêmica de origem endógena melhor que *B. lactis*. No entanto, *B. lactis* foi mais eficiente inibindo a colonização por *Candida* no trato gastro-intestinal, suprimindo a candidíase gástrica e protegendo os camundongos imunodeficientes de candidíase letal quando comparado a *B. infantis.* Com o estudo, concluiu-se que as espécies de *Bifidobacterium* estudadas podem proteger camundongos imunodeficientes contra candidíase, mas diferentes espécies manifestam diferenças em seus efeitos probióticos e terapêuticos.

Elahi et al. (37) realizaram um estudo com o objetivo de examinar o mecanismo de proteção induzido pela administração oral de espécies de *Lactobacillus* em modelo animal. Para o estudo foram usados camundongos DBA/2 sendo estes alimentados com *Lactobacillus* durante 14 dias, em seguida suas cavidades bucais foram contaminadas com *C. albicans.* Esse estudo demonstrou que a alimentação com *L. acidophilus* reduziu a duração da colonização da cavidade bucal por *C. albicans.* Esse fato está relacionado com

o aparecimento prematuro de RNAm de IL-4 e IFN-γ, dos produtos secretados pela estimulação dos nódulos linfáticos cervicais e com o aparecimento de IFN-γ e óxido nítrico na saliva.

Matsubara et al. (154) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a colonização experimental oral por *C. albicans* em camundongos imunossuprimidos após o tratamento com probióticos. Para o estudo foram utilizados camundongos DBA/2 imunossuprimidos e infectados oralmente por *C. albicans*. Após este processo, os animais foram tratados com probióticos *L. acidophilus* NCFM ou *L. rhamnosus* Lr-32, ou nistatina. O estudo demonstrou que os probióticos foram capazes de reduzir significantemente a colonização de *C. albicans* na mucosa bucal em modelo murino DBA/2, e o tratamento com *L. rhamnosus* Lr-32 mostrou ser mais eficaz que o tratamento com a nistatina.

Hasslöf et al. (155) realizaram um estudo com 8 cepas probióticas comerciais (*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, e *L. acidophilus* La5) e avaliaram o crescimento de *C. albicans* (*C. albicans* ATCC 28366; *C. albicans* ATCC 10231, e mais 3 cepas de *C. albicans* isolados da cavidade bucal)*, in vitro*. Concluíram que as cepas comerciais avaliadas foram capazes de inibir o crescimento de todas as cepas de *C. albicans* utilizadas no trabalho, mas a capacidade de redução entre as cepas de probióticos foram significativamente diferentes entre si.

Hatakka et al. (118), realizaram um ensaio clínico com o objetivo de testar a hipótese de que queijo contendo bactérias probióticas poderia reduzir a prevalência de *Candida* bucal. 92 idosos consumiram diariamente 50 gramas de queijo Emmental contendo uma mistura de cepas probióticas (*Lactococcus lactis; L. helveticus*; *L. rhamnosus* GG; *L. rhamnosus* LC705, e *Propionibacterium freudereichii* ssp *sermanii* JS) e 100 idosos consumiram queijo Edam sem suplementação probiótica. Foi observada uma redução de *Candida* na porcentagem de indivíduos, do grupo experimental que apresentava alta contagem de *Candida*, de 30% para 21% (32% de redução), e um aumento no grupo controle, de 28% para 34%. A intervenção com probiótico reduziu o risco de alta contagem de *Candida* em torno de 75%. Assim, concluiu-se que probióticos podem ser eficientes no controle de *Candida* bucal em idosos.

Por fim, Ishikawa (2011) (156), realizou um estudo clínico com o objetivo de avaliar a redução da prevalência de *Candida* bucal em usuários de próteses totais após utilização tópica de um bioproduto contendo probióticos. No grupo experimental, 30 usuários de próteses aplicaram o bioproduto contendo probióticos (*L. rhamnosus* HS111 e *L. acidophilus* HS101), por 5 semanas, na parte interna da prótese superior para que o produto ficasse em íntimo contato com a mucosa dos pacientes, já no grupo controle, 25 pacientes utilizaram o produto da mesma forma, entretanto, estes não continham probióticos na sua formulação. Foi observado no grupo experimental sucesso no tratamento em 25 (83,3%) das 30 pessoas, enquanto que no grupo controle, apenas 2 (8,0%) pessoas não foi possível isolar *Candida* das amostras bucais após 5 semanas de uso dos probióticos. Desta forma, concluiu-se que a mistura de probióticos, *L. rhamnosus* HS111 e *L. acidophilus* HS101 na forma de bioproduto, podem ser eficientes na redução da prevalência de *Candida* quando utilizados por usuários de próteses totais. E a capacidade dos probióticos em reduzir *Candida* independe de sua espécie.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 OBJETIVO GERAL

Testar a hipótese de que as bactérias probióticas suplementadas em queijo minas frescal possam reduzir a prevalência de *Candida* bucal em usuários de próteses totais que não apresentam sintomatologia de candidose ou estomatite sob prótese.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a prevalência de espécies de *Candida* nas amostras bucais de pacientes usuários de próteses totais que não apresentam sintomatologia de candidose ou estomatite sob prótese antes e após 8 semanas do experimento.

- Comparar a redução das UFCs de *Candida,* nas amostras coletadas dos pacientes, de acordo com o queijo ingerido.

- Comparar a produção das enzimas hidrolíticas, proteinase e fosfolipase, das espécies de *Candida* nos três grupos da pesquisa, em dois tempos, antes do início do experimento e ao seu final.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 TIPO DE ESTUDO

Este estudo caracteriza-se como um ensaio clínico com 2 grupos experimentais e 1 controle.

4.2 SUJEITOS DA PESQUISA

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP), parecer de aprovação FR 331277- protocolo número 55/10 (Anexo A).

Os participantes da pesquisa foram pacientes usuários de próteses totais que receberam tratamento reabilitador protético na FOUSP, que concordaram em participar voluntariamente, de acordo com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo B), impresso em 2 vias (paciente e pesquisador), devidamente compreendido e assinado pelo mesmo ou pelo seu responsável legal.

No total, foram triadas 135 pessoas, das quais 69 apresentaram resultado positivo para a presença de *Candida* sp. Antes do início do experimento, 8 pessoas desistiram de fazer o tratamento reabilitador protético e 1 pessoa disse não comer queijo. Portanto, o experimento iniciou com 60 sujeitos que foram alocadas aleatoriamente nos três grupos da pesquisa. Ao longo das 8 semanas do experimento, houve a desistência de 1 participante, do grupo experimental 1, que relatou não querer mais comer o queijo (Figura 4.1).

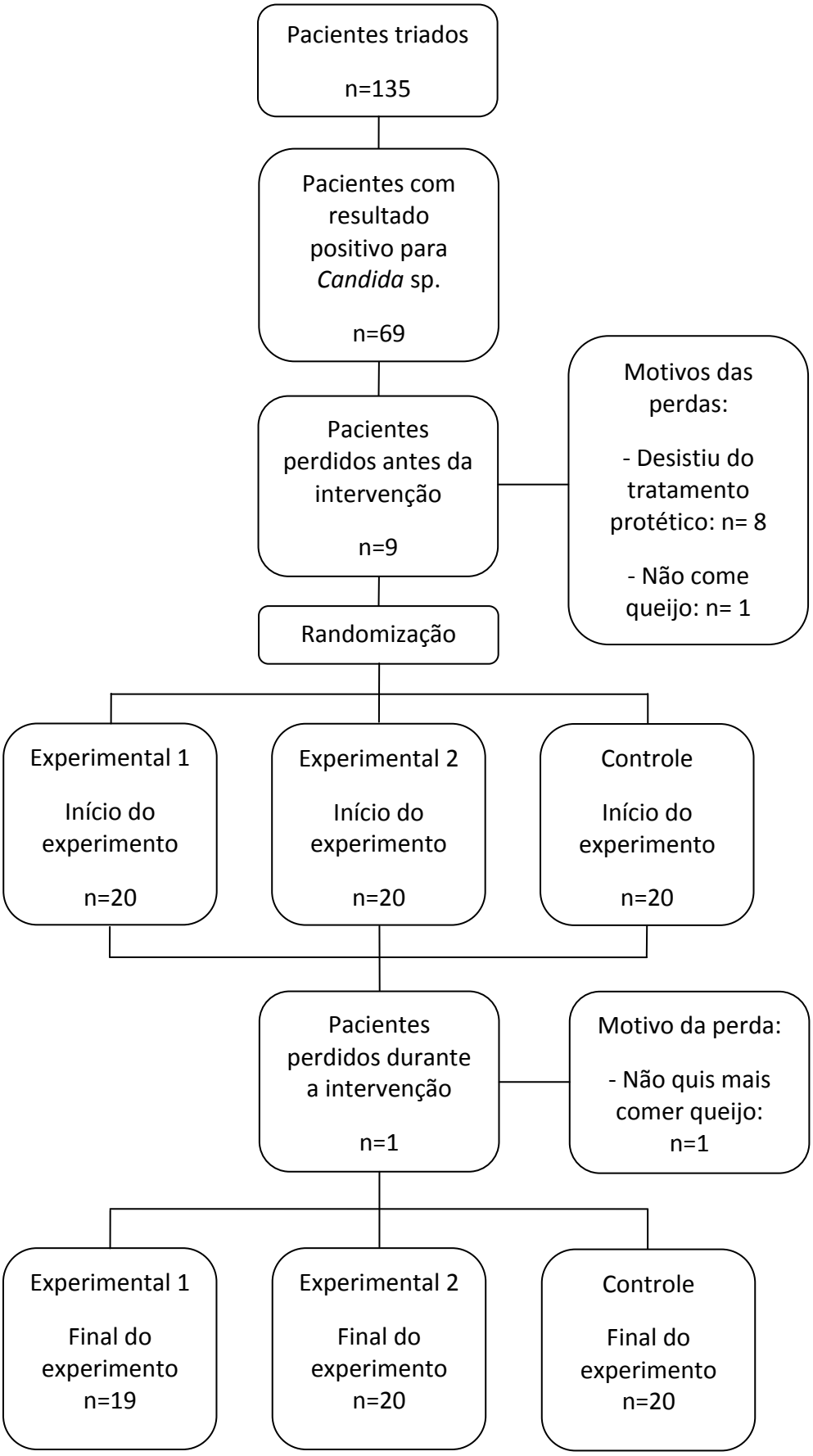

Figura 4.1 - Fluxograma da distribuição dos sujeitos da pesquisa

Para seleção dos participantes, foi aplicado um questionário de anamnese e feito exame clínico (Anexo C), além da coleta de amostra inicial da cavidade bucal para diagnóstico laboratorial da presença de *Candida* sp., realizados pela pesquisadora, através dos quais foram incluídos ou excluídos tais sujeitos. Além disso, para o exame clínico da saúde geral, houve a participação- antes, durante e após a pesquisa- da Dr.ª Vera Regina Pereira Pozzani, médica clínica servidora Comissionada do SUS da Faculdade de Odontologia da USP. Foram levados em consideração os critérios de inclusão e exclusão citados a seguir.

4.2.1 Critérios de inclusão

Os critérios de inclusão utilizados foram: pacientes voluntários, usuários de próteses, com achado subclínico para *Candida* na cavidade bucal - ausentes de sintomas da candidose - que apresentaram resultado positivo para a presença do fungo após teste de cultura laboratorial. Portanto, os indivíduos que não manifestaram sintomas da candidose bucal, mas que apresentaram *Candida,* foram incluídos na pesquisa.

4.2.2 Critérios de exclusão

Já os critérios de exclusão foram: a presença de demência; pacientes cardiopatas; transplantados; com problemas renais ou que faziam uso de algum tipo de medicação para tratamento de infecções bucais, ou de antibióticos 2 meses antes do início da pesquisa; pacientes com doenças de base descompensadas; pacientes que possuíam problemas intestinais, como por exemplo, intolerância à lactose ou aos derivados do leite, além daqueles que, como dito anteriormente, apresentaram sintomas da candidose, sendo

estes tratados separadamente com os antifúngicos tradicionais, nistatina ou miconazol.

4.3 PROTOCOLO DE ESTUDO E INTERVENÇÃO

O protocolo da pesquisa utilizado foi duplo-cego randomizado, para tanto, os queijos foram embalados e identificados como A, B e C, respectivamente, grupo experimental 1 e 2, e controle, com a finalidade da pesquisadora somente identificá-los ao final do experimento.

O experimento teve uma duração de 8 semanas. A cada 14 dias, cada sujeito recebeu uma caixa de isopor contendo uma embalagem plástica com 14 fatias de queijo com 20 g cada (Figura 4.2). Para se garantir o transporte do alimento, foi posto gelo picado dentro de cada caixa de isopor (Figura 4.3).

Figura 4.2 - Caixa de isopor para transporte da embalagem com queijo

Figura 4.3 - Caixa de isopor contendo embalagem com queijo e gelo picado

4.4 GRUPOS DA PESQUISA

Os grupos foram divididos em: experimental 1 e 2, e controle. O grupo controle correspondeu aos sujeitos que ingeriram o queijo sem adição dos probióticos; o experimental 1, ingeriu o queijo contendo *Lactobacillus acidophilus* NCFM, e o experimental 2, *Lactobacillus rhamnosus* Lr-32.

Os queijos possuíam uma vida de prateleira de aproximadamente 21 dias (157), porém para se garantir a qualidade do produto, estes foram entregues a cada 14 dias.

4.4.1 Estudo piloto para produção do queijo minas frescal

Os testes pilotos foram realizados para haver uma padronização do produto garantindo a qualidade de consumo, assim como a viabilidade das bactérias probióticas.

O estudo piloto e o produto final foram elaborados com a colaboração da Prof.ª Dr.ª Susana Marta Isay Saad, Professora Associada do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

A produção do queijo já foi testada em diversos trabalhos (158-162) sendo este comprovadamente viável para o consumo, com controle rigoroso de qualidade de produção e armazenamento, garantindo desta forma, a não contaminação e a viabilidade das bactérias probióticas até o seu consumo final.

A utilização do queijo minas frescal foi eleita como veículo de administração, pois é um alimento comumente consumido no Brasil, adequado ao paladar brasileiro e por não existir no país um produto comercial que em sua composição contenha as bactérias probióticas utilizadas neste experimento.

O queijo funcional contém a dose diária da cultura probiótica especificada pela ANVISA (127) de 10^8 a 10^9 unidades formadoras de colônia (UFC) na porção diária do alimento, e o placebo foi produzido no mesmo local,

apresentando semelhança quanto à cor, aroma, textura e embalagem, porém sem as bactérias probióticas.

4.4.1.1 Padronização da quantidade de *Lactobacillus* sp. utilizada para produção dos queijos dos grupos experimentais

Inicialmente, foi verificada a quantidade de UFC por grama de *Lactobacillus* sp. liofilizados informada pelo fabricante, isto é, para cada grama de *L. acidophilus* NCFM ou *L. rhamnosus* Lr-32 liofilizados contém quantidades superiores a 200 bilhões de UFC. Desta forma, 0,1 g de cada um dos lactobacilos foi diluído em 10 ml de água peptonada 0,1 % (diluição 10^{-1}). As diluições decimais subsequentes foram preparadas utilizando-se o mesmo diluente. A sequência da metodologia está apresentada nas figuras 4.4 a 4.7.

Figura 4.4 - *L. acidophilus* ou *L. rhamnosus* diluídos em água peptonada

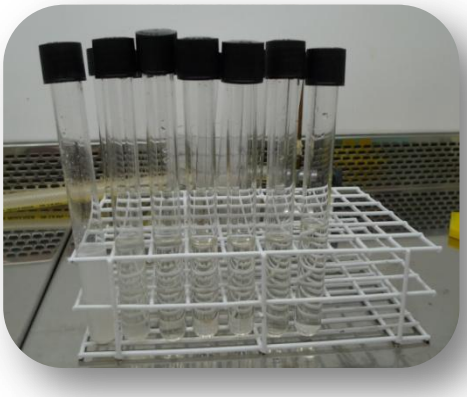

Figura 4.5 - Diluição seriada

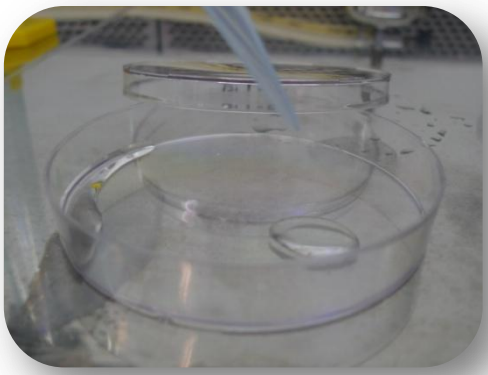

Figura 4.6 - Inóculo em placa de Petri

Figura 4.7 - Colocação do meio fundido

Para a contagem das colônias de *L. acidophilus* NCFM foi utilizado o meio basal *DeMan- Rogosa- Sharpe* (MRS) modificado, adicionando-se maltose em substituição à glicose, conforme descrito pela International Dairy Federation (IDF Standard 306, 1995), fundido e resfriado a cerca de 45°C (Anexo C). Enquanto que para a contagem de *L. rhamnosus* Lr-32 foi necessário testar três meios basais: MRS sem modificação, MRS modificado e MRS acidificado com ácido acético, pois num primeiro momento, não foi observado crescimento das colônias de *L. rhamnosus* Lr-32 no meio basal utilizado para *L. acidophilus* NCFM.

Após testes com os três meios, optou-se por utilizar o meio basal MRS sem modificação por apresentar melhores resultados.

Observou-se que a quantidade de lactobacilos correspondia àquela informada pelo fabricante (Figura 4.18 e 4.19).

Para produção do queijo minas frescal utilizou-se 2,5 g de *L. acidophilus* NCFM e 2,5 g de *L. rhamnosus* Lr-32. As etapas da produção estão descritas no item 4.4.2. Entretanto, no queijo suplementado com *L. rhamnosus* Lr-32 não foi observado a viabilidade necessária por grama do queijo (Figura 4.19). Portanto, optou-se por aumentar a sua quantidade para 3,5 g.

4.4.1.2 Amostragem e análise microbiológica dos queijos

As determinações dos parâmetros microbiológicos ocorreram após o processamento dos queijos minas frescal, no dia seguinte (d_0) e após 7 (d_1) e 14 (d_2) dias de armazenamento a 5±1°C (Figura 4.8).

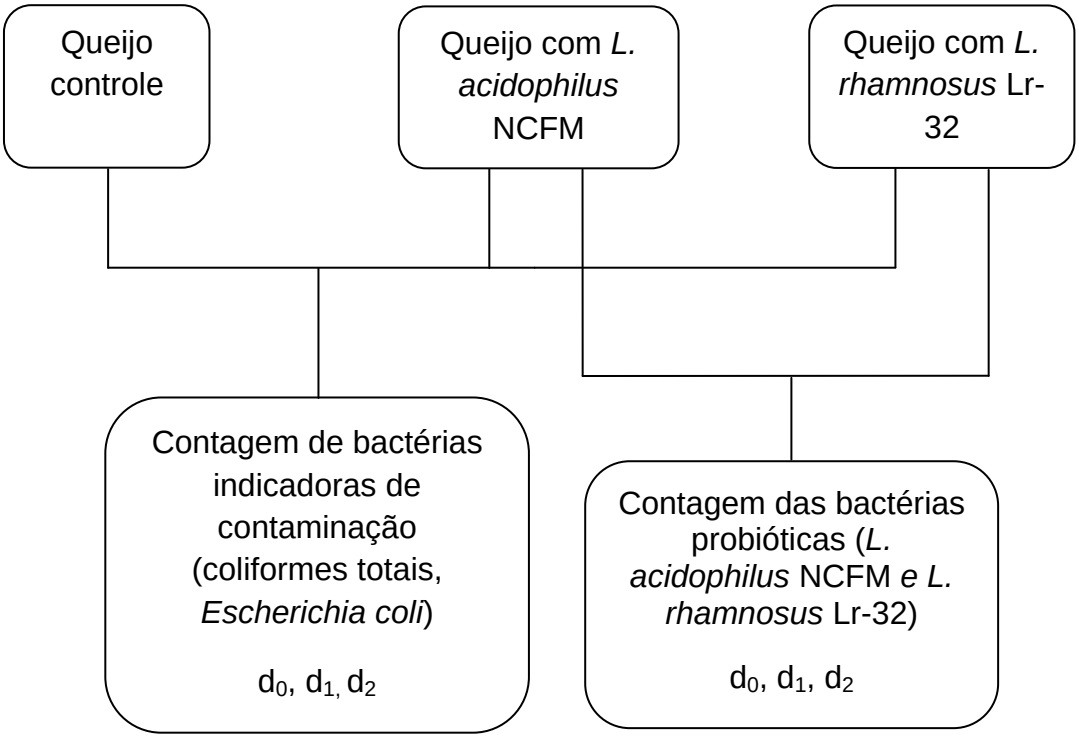

Figura 4.8 - Fluxograma da amostragem e análises microbiológicas dos queijos minas frescal

4.4.1.2.1 Monitoramento das bactérias probióticas: *L. acidophilus* NCFM e *L. rhamnosus* Lr-32

4.4.1.2.1.1 *L. acidophilus* NCFM

Nos queijos processados com a adição de *L. acidophilus* NCFM quantificou-se a população das bactérias probióticas em log UFC g^{-1} de queijo. Para isto, porções de 25 g de queijo (retiradas em condições de assepsia, em

fluxo laminar) foram homogeneizadas com 225 ml de água peptonada 0,1 % (diluição 10^{-1}), utilizando-se um “Bag Mixer” (Intersciense, St. Nom, França), por 210 segundos. As diluições decimais subsequentes foram preparadas utilizando-se o mesmo diluente.

Alíquota de 1 ml de cada diluição das amostras foi transferida para placas de Petri estéreis. Em seguida, adicionou-se ágar MRS modificado, preparado como meio basal e adicionado de maltose (em substituição à glicose), fundido e resfriado, com posterior incubação a 37 °C por 48 horas. Cada amostra foi inoculada em duplicata.

4.4.1.2.1.2 *L. rhamnosus* Lr-32

Para a contagem de *L. rhamnosus* Lr-32, utilizou-se o mesmo protocolo de diluição anteriormente citado, entretanto, as amostras foram transferidas para placas de Petri estéreis. Em seguida, adicionou-se ágar DeMan- Rogosa-Sharpe- MRS (Oxoid) sem modificação, fundido e resfriado, com posterior incubação a 37°C por 48 horas. Cada amostra foi inoculada em duplicata.

A sequência da metodologia para a contagem de *L. acidophilus* NCFM e *L. rhamnosus* Lr-32 está representada pelas figuras a seguir (Figura 4.9 a 4.15).

Figura 4.9 - Pesagem da amostra

Figura 4.10 - Homogeneização no Bag Mixer

Figura 4.11 - Amostra em água peptonada (diluição 1 g de queijo:9 ml água)

Figura 4.12 – Transferência de 1 ml para realização da diluição seriada

Figura 4.13 - Diluição seriada

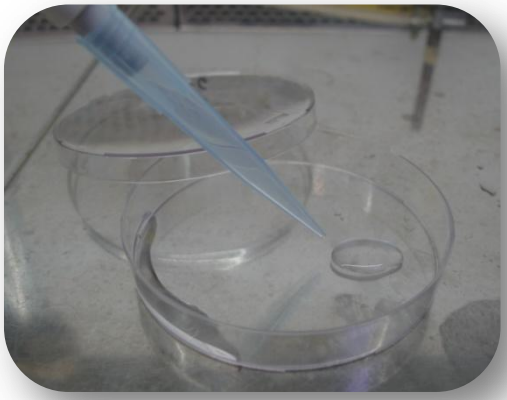

Figura 4.14 - Inóculo em placa de Petri

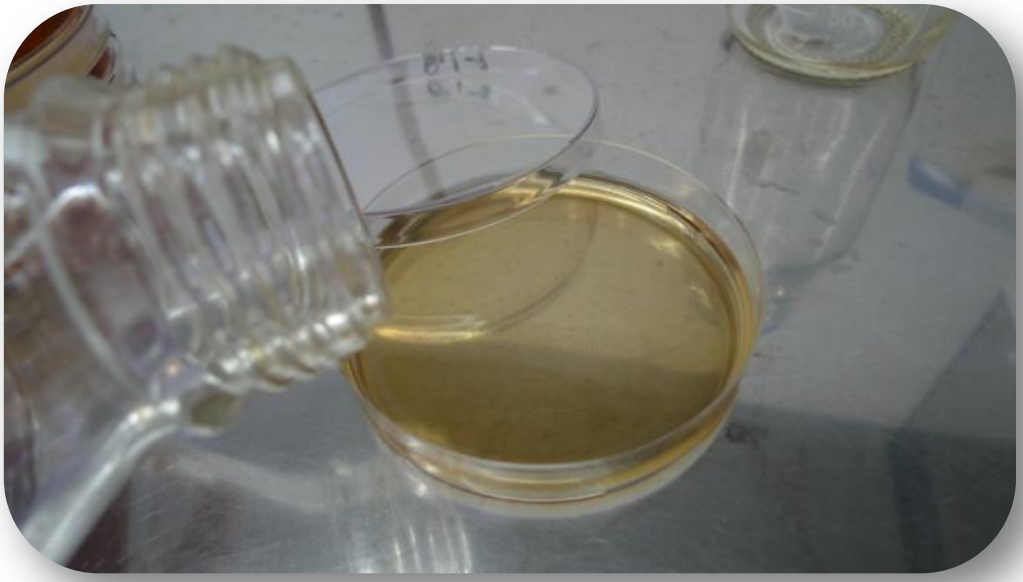

Figura 4.15 - Colocação do meio fundido

As leituras das placas foram realizadas após 48 horas de incubação a 37°C (Figura 4.16 e 4.17).

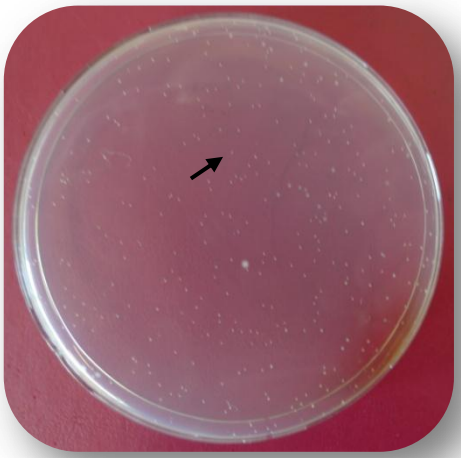

Figura 4.16 - Seta indica a morfologia da colônia de *L. acidophilus* NCFM

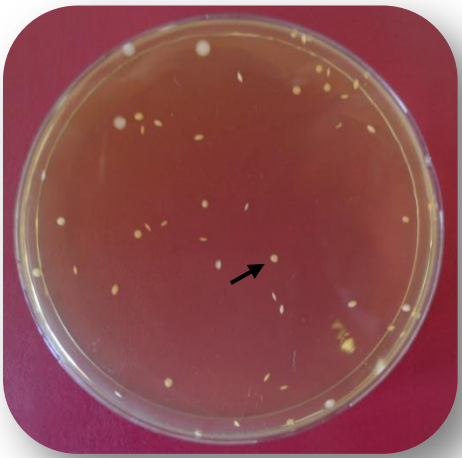

Figura 4.17 - Seta indica a morfologia da colônia de *L. rhamnosus* Lr-32

Os resultados do estudo piloto mostraram que as populações de *L. acidophilus* NCFM (Figura 4.18) e *L. rhamnosus* Lr-32 (Figura 4.19) apresentaram quantidades viáveis ao longo dos 14 dias testados.

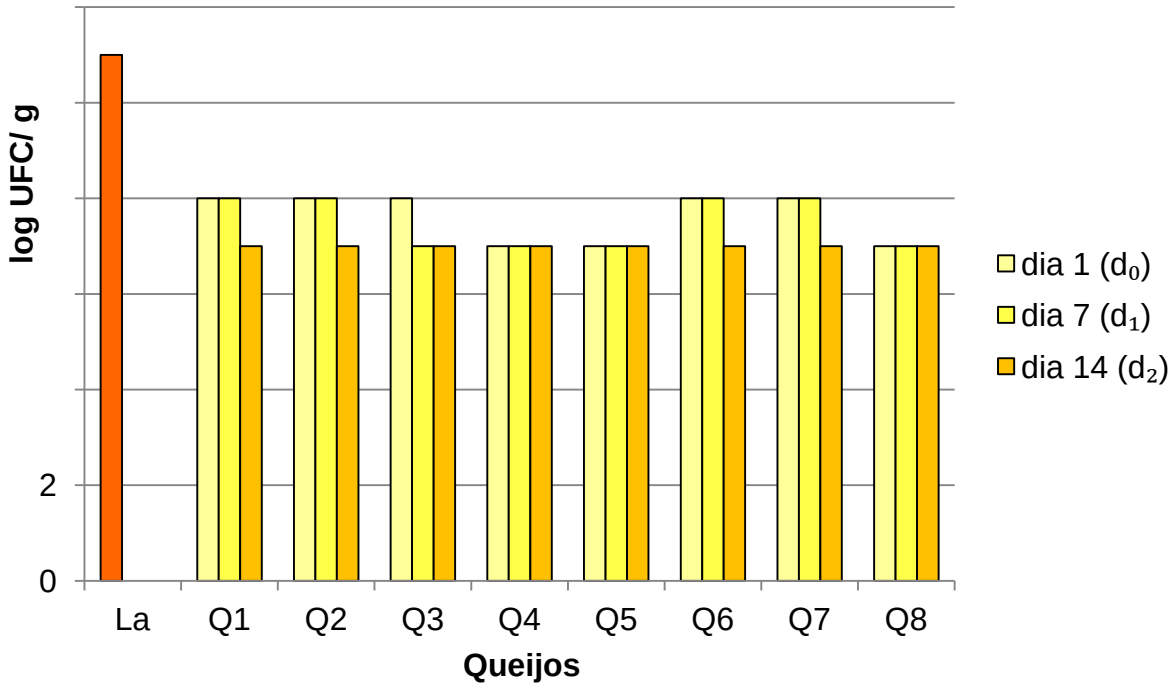

Figura 4.18 - Populações de *L. acidophilus* NCFM (média) obtidas para os queijos produzidos com a suplementação do mesmo, após 1, 7 e 14 dias de armazenamento refrigerado a 5± 1° C. La- corresponde à viabilidade testada de *L. acidophilus* NCFM informada pelo fabricante

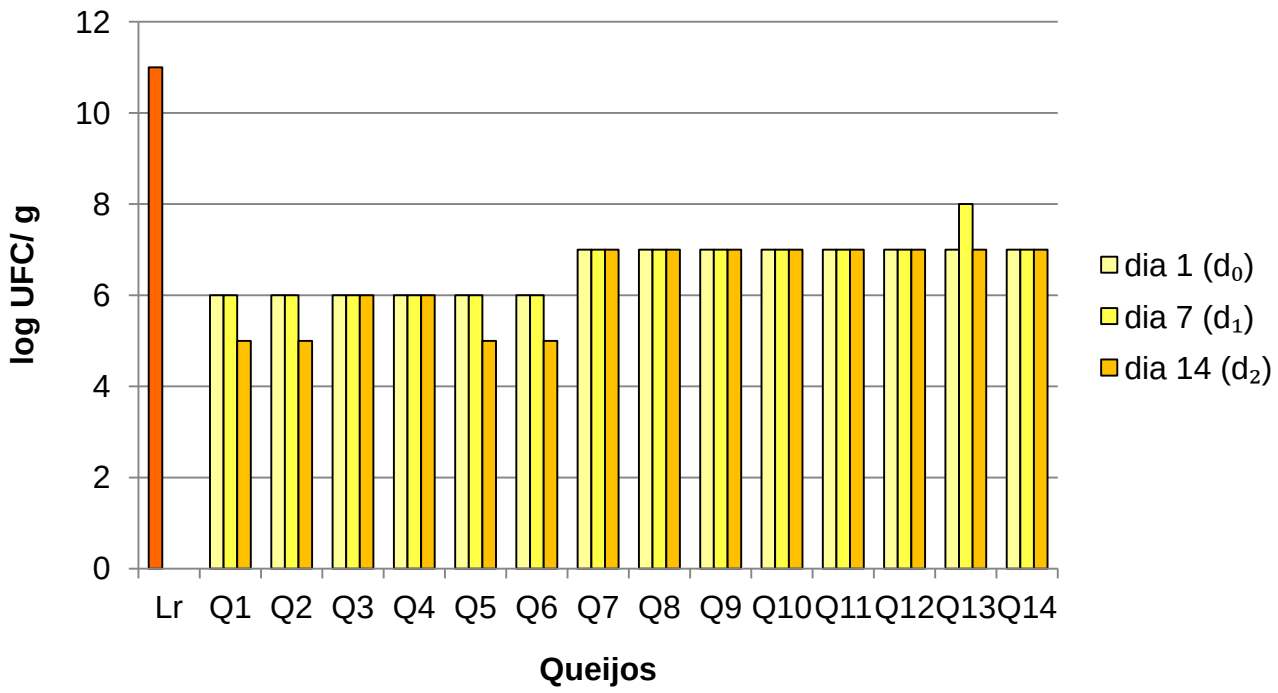

Figura 4.19- Populações de *L. rhamnosus* Lr-32 (média) obtidas para os queijos produzidos com a suplementação do mesmo, após 1, 7 e 14 dias de armazenamento refrigerado a 5± 1° C. Lr- corresponde à viabilidade testada de *L. rhamnosus* Lr-32 informada pelo fabricante. Queijos Q1- Q6 correspondem àqueles produzidos inicialmente com 2,5 gramas de *L. rhamnosus* Lr-32 liofilizado. Queijos Q7- Q14 correspondem àqueles produzidos com 3,5 gramas de *L. rhamnosus* Lr-32 liofilizado

4.4.1.2.2 Monitoramento das bactérias indicadoras de contaminação: coliformes totais e *Escherichia coli*

Alíquota de 1000 µl de cada diluição das amostras foi transferida de acordo com as instruções do fabricante, para placas Petrifilm™ para a contagem de coliformes totais e *E.coli*, denominadas Petrifilm™EC (3M Microbiology, St. Paul, MN, EUA), sendo incubadas a 37°C por 48 horas. Cada amostra foi inoculada em duplicata.

A sequência da metodologia realizada para verificar a contaminação está representada pelas figuras a seguir (Figura 4.20 a 4.23):

Figura 4.20 - Diluição seriada

Figura 4.21 - Placa Petrifilm™ EC

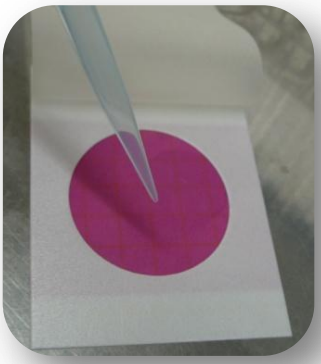

Figura 4.22 - Inóculo em placa

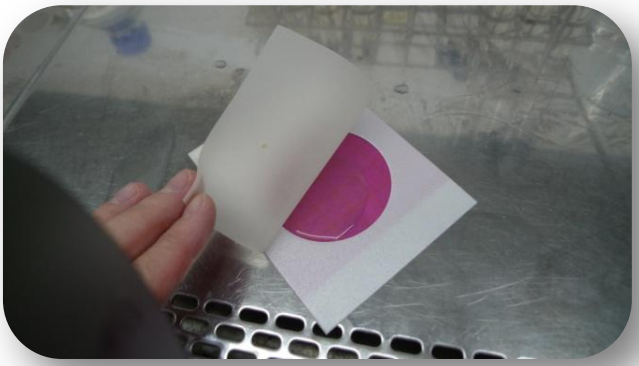

Figura 4.23 - Assentamento da película plástica

As leituras das placas foram feitas pós 48 de incubação a 37°C (Figura 4.24 a 4.26):

Figura 4.24 - Sem crescimento = 0

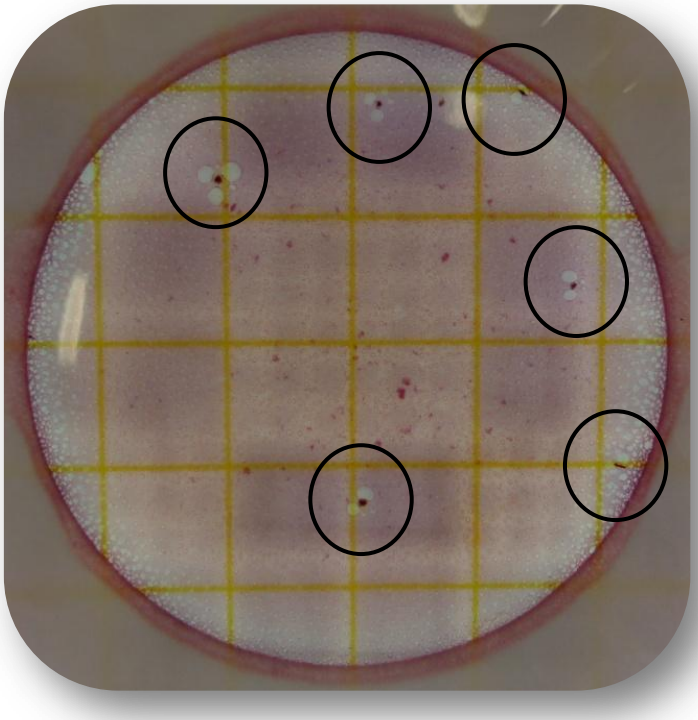

Figura 4.25 - Contagem de *E. coli* = 0, contagem de coliformes totais = 6

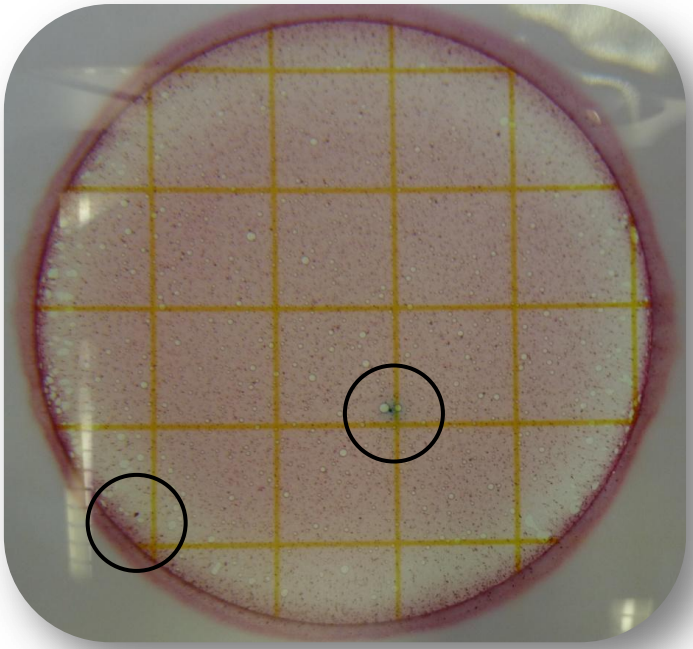

Figura 4.26 - Contagem de *E. coli* = 1, contagem de coliformes totais = 2

Os queijos suplementados com *L. acidophilus* NCFM, *L. rhamnosus* Lr-32 e o queijo controle apresentaram valores médios na contagem de *E. coli* e coliformes totais menores que 1 log UFC/g. A legislação brasileira vigente estabelece que queijos como o minas frescal apresentem como limites máximos a presença de 5 x 10^2 UFC/ g de coliformes (163).

4.4.2 Produção do queijo minas frescal

As principais etapas empregadas na fabricação do produto final encontram-se relacionadas na Figura 4.27.

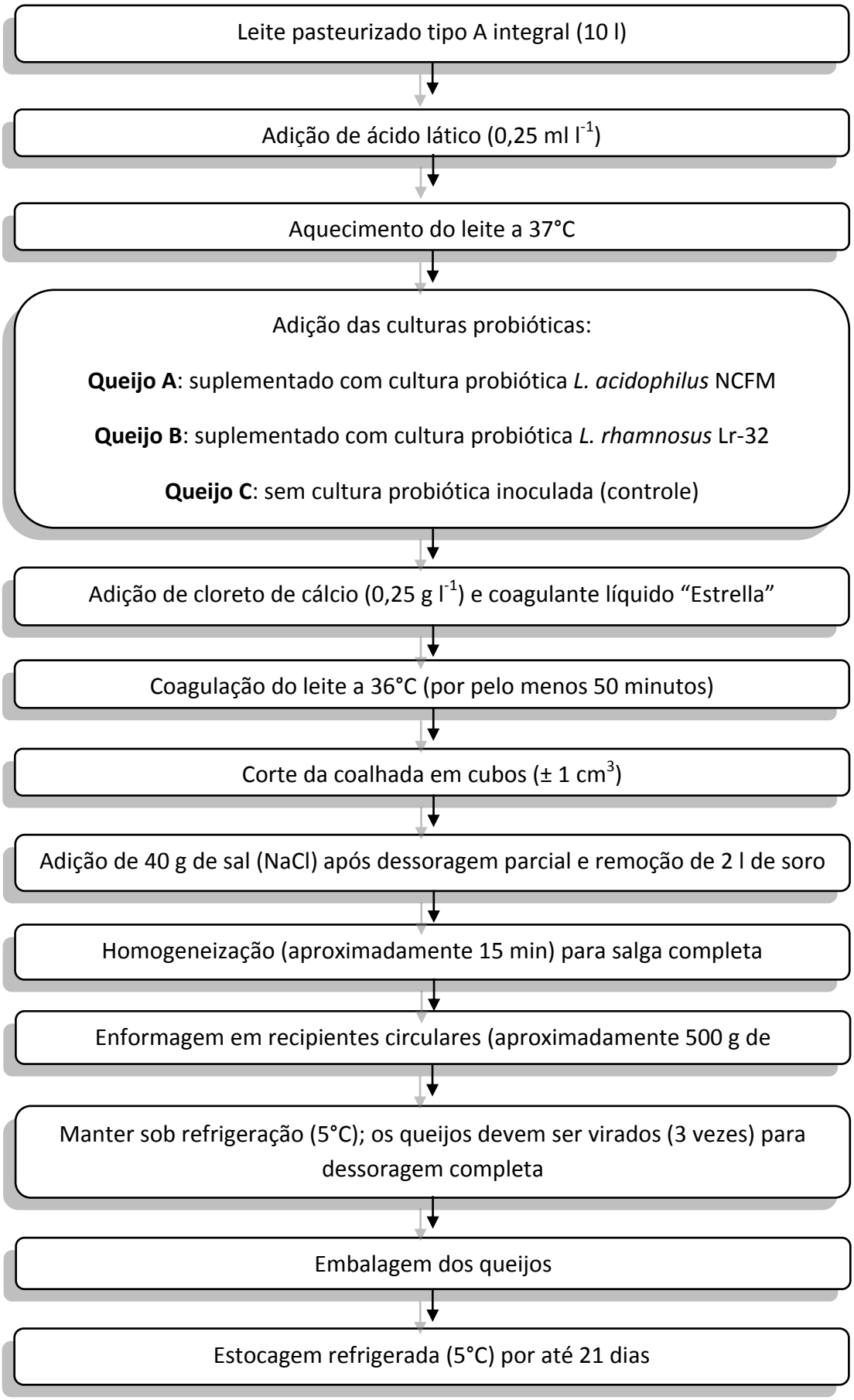

Figura 4.27: Protocolo de produção do queijo minas frescal A, B e C (157)

As culturas empregadas foram fornecidas pelo fabricante na forma liofilizada e armazenadas congeladas. O queijo A foi suplementado com *Lactobacillus acidophilus* NCFM (Danisco-DuPont, Madison, WI, USA); o queijo B com *Lactobacillus rhamnosus* Lr-32 (Danisco-DuPont, Madison, WI, USA), e o queijo C sem suplementação de cultura probiótica. A adição de ácido lático foi feita na proporção de 2,5 ml do ácido a 85% para cada 10 l de leite integral pasteurizado tipo A (marca comercial Xandô, São Paulo, Brasil), mediante diluição prévia (1:10). Em todas as formulações empregou-se o coagulante líquido “Estrella” (Enzima Quimosina, poder coagulante 1: 3.000/ 75 IMCU, Christian Hansen) e o cloreto de cálcio (2,5 g/10 l de leite), sendo que os mesmos foram utilizados após a adição do ácido lático e/ou da cultura probiótica. A salga dos queijos foi feita com a adição 40 g de sal – NaCl - (marca comercial Cisne, Cabo Frio, Brasil) ao soro após a dessoragem parcial (remoção de aproximadamente, 2 l de soro), sendo que a quantidade adicionada equivale a 2,0 % do peso líquido estimado dos queijos. Após serem desenformados, os queijos foram cortados em pedaços de 20 g; colocados em embalagens plásticas e, mantidas refrigeradas (5°C) até o dia da entrega.

Nas figuras (Figura 4.28 a 4.40) a seguir está representada a sequência da produção do queijo minas frescal

Figura 4.28 - Aquecimento do leite (com ácido lático) a 37°C

Figura 4.29 - Adição de cloreto de cálcio

Figura 4.30 - Adição de coagulante

Figura 4.31 - Adição da cultura probiótica no queijo A ou B

Figura 4.32 - Coagulação do leite a 36 °C por pelo menos 50 minutos

Figura 4.33 - Teste da faca

Figura 4.34 - Corte da coalhada

Figura 4.35 - Dessoragem parcial

Figura 4.36 - Salga

Figura 4.37 - Homogeneização

Figura 4.38 - Enformagem

Figura 4.39 - Enformagem e estocagem sob refrigeração a 5°C

Figura 4.40 - Viragens para dessoragem completa

4.5 COLETA DAS AMOSTRAS BUCAIS

Durante o exame clínico da cavidade bucal, os dados foram registrados na ficha do paciente (Anexo D). Estes receberam orientação para não ingerir alimentos ou bebidas (exceto água) ou fumar, no período de 1 hora antes da coleta. Todos receberam orientação de higiene bucal e da prótese. Além disso, antes, durante e após o período de intervenção, foi proibido o consumo de produtos contendo probióticos.

4.5.1 Escolha da metodologia de coleta

Vários são os métodos disponíveis para o isolamento de *Candida* sp. da cavidade bucal, dentre eles podem ser citados: uso de *swab* para esfregaço da superfície a ser analisada (164); técnica de *imprint culture* (165); coleta da saliva total (166), coleta do enxaguado bucal (51), e biópsia da mucosa bucal. Cada uma delas oferecem vantagens e desvantagens que devem ser levadas

em conta para que se possa comparar os resultados obtidos com a literatura. Neste trabalho optou-se por utilizar a metodologia de coleta descrita por Samaranayake et al. (51) pois é uma técnica rápida e fácil que permite a quantificação de micro-organismos da cavidade bucal, apesar de não permitir identificar o sítio de infecção. Contudo, esta desvantagem não foi levada em consideração, pois nesta pesquisa foram utilizados pacientes assintomáticos, isto é, estes não apresentavam sinais de candidose ou estomatite sob prótese, mas possuíam uma microbiota composta por *Candida* sp.

A metodologia para coleta das amostras de *Candida* sp. da cavidade bucal descrita por Samaranayake et al. (51), consiste em pedir ao paciente que faça um bochecho com 10 ml de solução salina estéril, por 60 segundos. Imediatamente após a coleta, o enxaguado bucal foi transportado até o laboratório, em tubos de Falcon estéreis, para as análises microbiológicas.

As amostras para quantificação total foram coletadas nos tempos: inicial (t_0)- 1 semana antes do início do experimento e final (t_f)- após 8 semanas de ingestão do queijo.

4.5.2 Quantificação de *Candida* sp.

A cultura microbiológica é um procedimento extremamente importante para o isolamento primário do micro-organismo, isto é, para que o mesmo exerça sua capacidade de crescer, a partir de um material clínico, em um meio de cultura nutricional artificial e específico para cada um. Atualmente, utiliza-se como meio basal para fungos, o ágar Sabouraud dextrose (ASD) acrescido de algum tipo de antibiótico com a finalidade de inibir o crescimento de bactérias. Além disso, para facilitar a evidenciação de infecções mistas por leveduras, utiliza-se o meio cromogênico CHROMagar *Candida*® (CHROMagar, Paris, França) em placa. Após a cultura do micro-organismo pode ser observado o seu crescimento macroscopicamente, pela formação de uma unidade estrutural denominada de colônia.

Portanto, para quantificação total de *Candida* da cavidade bucal foi utilizada a metodologia descrita a seguir.

No laboratório, as amostras bucais foram centrifugadas a 1700 g por 10 minutos. O *pellet* foi posteriormente resuspenso em 3 ml de salina estéril e agitado por 30 segundos, com a finalidade de obter- se um concentrado do enxaguado bucal. As diluições decimais subsequentes foram preparadas utilizando-se o mesmo diluente. Alíquota de 100 µL foi semeada em superfície de placas de Petri estéreis (90 mm de diâmetro) contendo ASD com cloranfenicol (0,05 g l^{-1}), e incubadas aerobicamente a 37 °C por 24-48 horas. Cada amostra foi semeada em triplicata.

A quantificação das amostras de *Candida* foi feita através da contagem em log UFC ml^{-1} do enxaguado coletado, e posteriormente, esse valor foi corrigido para os 10 ml do enxaguado original.

A sequência da metodologia de coleta está representada nas figuras a seguir (Figura 4.41 a 4.45).

Figura 4.41 - Enxaguado bucal

Figura 4.42 – Centrífugação das amostras coletadas

Figura 4.43 - Diluição seriada

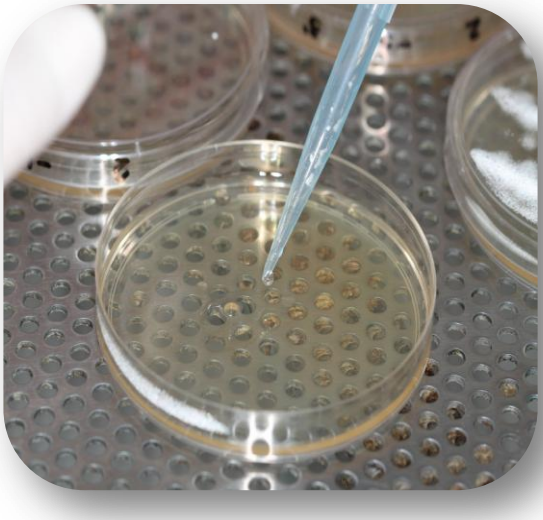

Figura 4.44 - Inóculo em placa

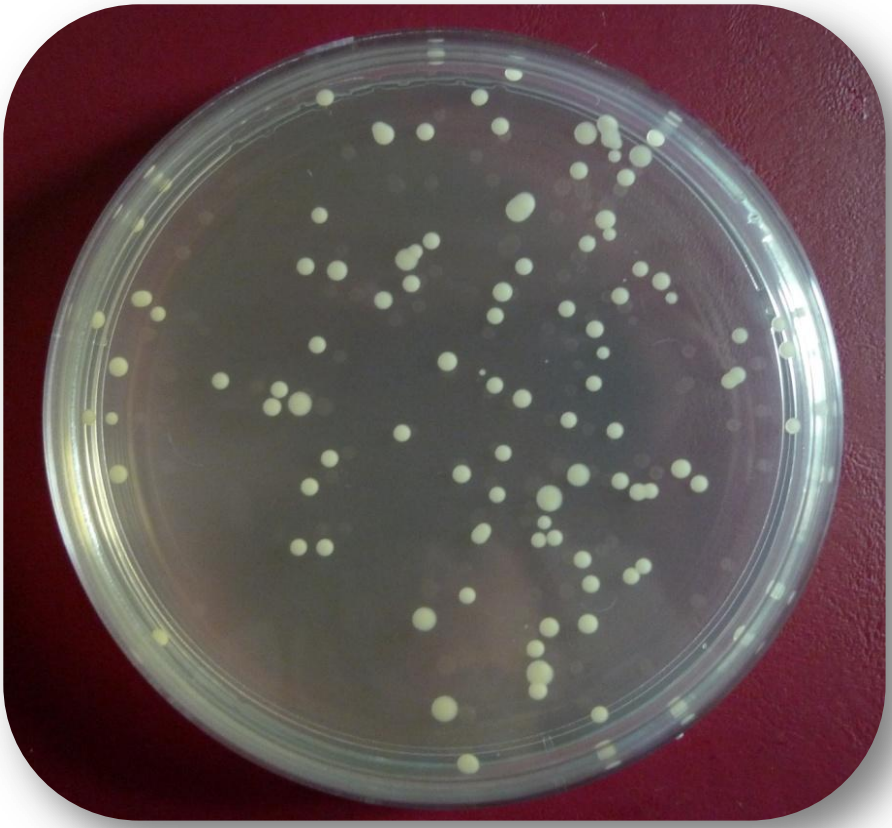

Figura 4.45 - Colônias de *Candida* sp.

4.5.3 Identificação das espécies de *Candida*

A identificação das espécies foi realizada nos tempos t_0 (inicial) e t_f (final) do experimento.

4.5.3.1 CHROMagar *Candida*®

O meio CHROMagar *Candida*® possui em sua composição substâncias cromogênicas que permite, de forma presuntiva, observar infecções mistas de leveduras e diferenciá-las quanto à sua coloração.

De acordo com o fabricante, colônias que apresentam coloração verde são sugestivas de *C. albicans* ou *C. dubliniensis.* Desta forma, para diferenciação entre as mesmas, essas foram submetidas a testes fenotípicos de temperatura (42°C e 45°C) (167, 168) e de tolerância em caldo Sabouraud hipertônico (169). Já amostras que apresentam coloração diferente de verde são sugestivas de *Candida* não-*albicans*. Estas foram identificadas através do sistema API 20C® Aux System (bioMérieux, Basingstoke, UK).

Através das diluições utilizadas para a quantificação de *Candida* sp., alíquotas de 100µL foram semeadas em duplicatas sobre meio de cultura cromogênico CHROMagar *Candida*® em aerobiose a 37 °C por 72 horas. Após esse período, as mesmas foram analisadas quanto à coloração e morfologia de cada colônia, além da possibilidade de cultura pura e/ou mista.

Todas as amostras foram submetidas a testes fenotípicos e bioquímicos nutricionais, tais como provas do tubo germinativo, microcultivo em lâmina e fermentação de carboidratos.

Coloração e morfologia das colônias em placas com meio CHROMagar *Candida*® podem ser observadas nas figuras a seguir (Figura 4.46 a 4.51).

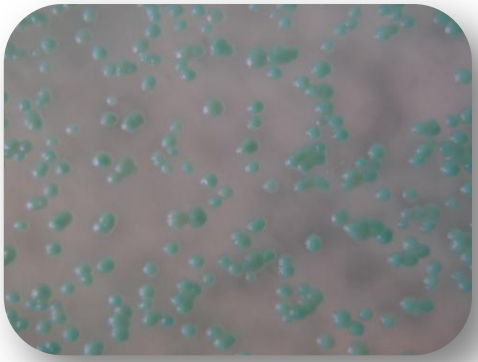

Figura 4.46 - Colônias verdes

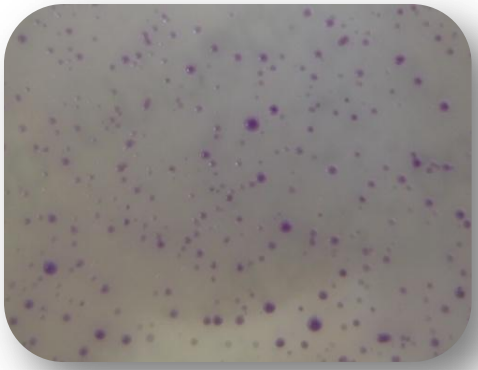

Figura 4.47 - Colônias lilás

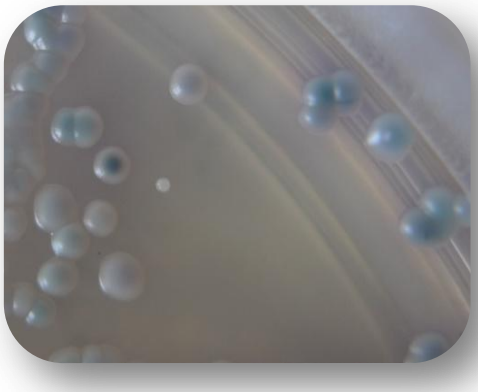

Figura 4.48 - Colônias azuis

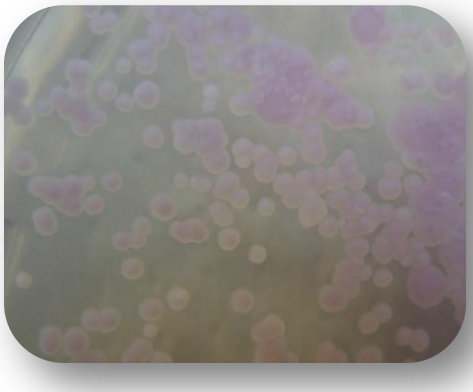

Figura 4.49 - Colônias rosas esbranquiçadas

Figura 4.50 - Colônias creme

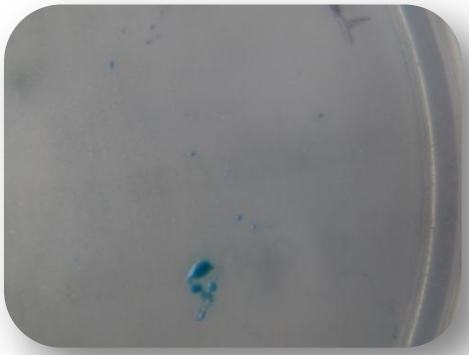

Figura 4.51 - Colônias azuis metálicas

4.5.3.2 Prova do tubo germinativo

A prova do tubo germinativo (170) é um teste que caracteriza rápida e presuntivamente a levedura da espécie *C. albicans* ou *C. dubliniensis* (tubo germinativo positivo) de outras espécies de levedura (tubo germinativo negativo).

Quando o teste for positivo, o tubo germinativo aparecerá como um filamento fino e cilíndrico, originado do blastoconídeo da levedura, no qual não se observa nenhuma zona de constricção, quer na base ou ao longo de sua extensão (Figura 4.52).

A partir de uma alçada da colônia isolada, submetida a crescimento prévio de 24-48 horas, faz-se uma suspensão em tubos contendo 0,5 ml de soro fetal bovino estéril (Vitrocell- Embriolife, Campinas-SP). Incuba-se a 37ºC durante período máximo de 3 horas. Este prazo é importante porque, após esse período, outras espécies de *Candida* e de outros gêneros, formam também tubo germinativo. Deposita-se uma gota da suspensão sobre lâmina de microscopia e cobre-se com lamínula para observação em microscópio ótico. A presença de tubo germinativo, na forma de pequeno filamento que brota do blastoconídio, sem formar constricção com a célula-mãe, permite a identificação presuntiva de *C. albicans* ou *C. dubliniensis.*

A prova do tubo germinativo foi realizada em dois ensaios independentes.

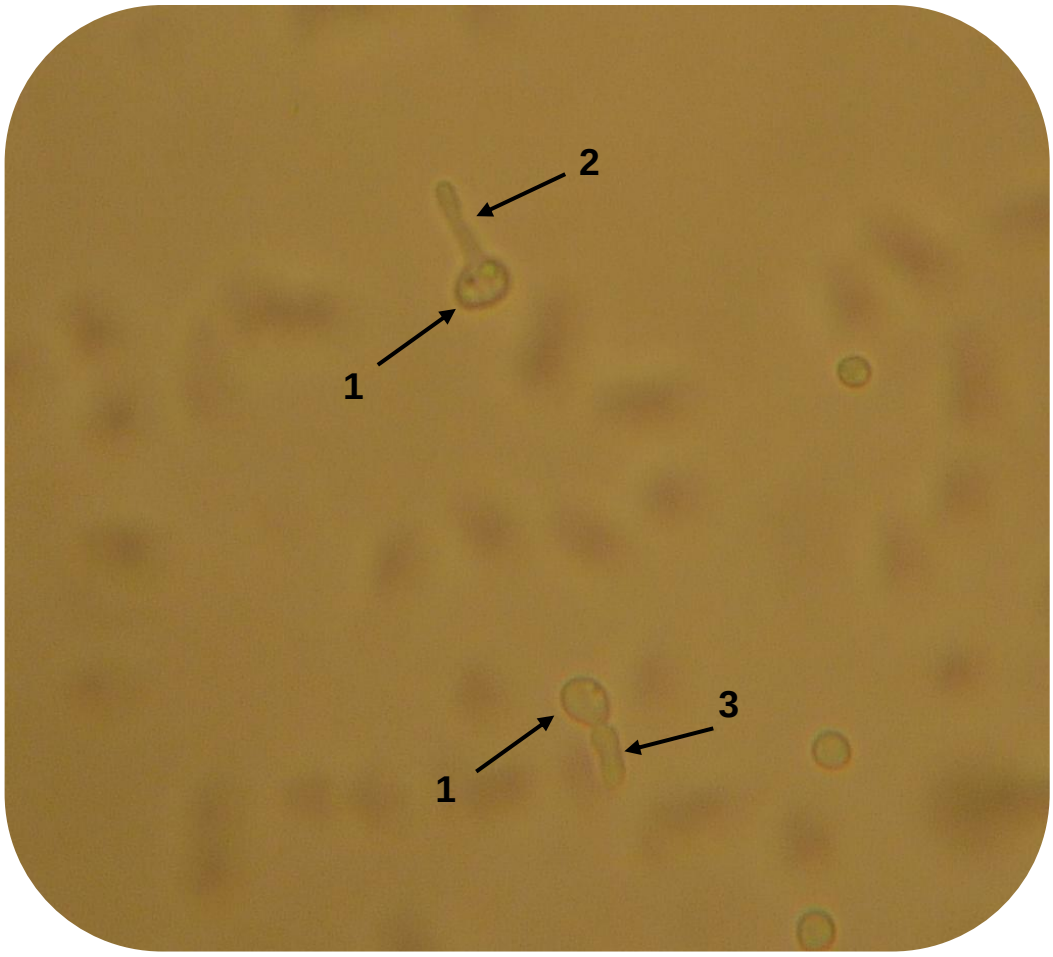

Figura 4.52 - Tubo germinativo positivo- blastoconídeo (seta 1) de levedura emergindo um tubo germinativo (seta 2), Tubo germinativo negativo- blastoconídeo (seta 1) de levedura emergindo uma pseudo-hifa (seta 3)

4.5.3.3 Prova do microcultivo em lâmina

A prova do microcultivo em lâmina, de acordo com o método de Dalmau, baseia-se no princípio de que leveduras, quando incubadas em meio fubá (“corn meal ágar” + tween 80) com Tween-80, por 48 até 96 horas, apresentam a capacidade de filamentar, formando pseudo-hifas e/ou hifas verdadeiras. Assim, pelas características morfológicas das estruturas filamentosas, pode-se sugerir a espécie de levedura. Caso a levedura forme hifas hialinas ramificadas sem fragmentação, provavelmente pertence ao gênero *Candida* e se houver a formação de clamidósporos característicos (Figura 4.53) é classificada como *Candida albicans* ou *Candida dubliniensis.*

Após preparação e esterilização do meio (Anexo E), este foi disposto sobre uma lâmina de microscopia estéril. Com o auxílio de uma alça, tocamos levemente uma colônia, submetida a crescimento prévio de 24-48 horas; fazemos três estrias equidistantes sobre este meio, e colocamos uma lamínula sobre elas. Armazenamos as lâminas em placas de vidro estéreis e levamos a incubadora a 30 °C por 48 a 96 horas. Antes disso, tornamos o ambiente da placa úmido.

A prova do microcultivo foi realizada em dois ensaios independentes.

Figura 4.53 - Clamidoconídeo

4.5.3.4 Fermentação de carboidratos

Testes bioquímicos como o de fermentação de carboidratos, também, conhecido como zimograma, são conduzidos no sentido de investigar a capacidade das leveduras têm de crescer anaerobiamente na presença de determinado carboidrato fornecido como única fonte de energia, podendo ser observada através da produção de gás carbônico. Determinadas fontes de carboidratos são colocadas em tubos respectivos, contendo meio básico líquido (Anexo F) e tubos Durhan invertidos previamente esterilizados. Culturas recentes das amostras (24 horas) são preparadas em 1,2 ml de água destilada estéril, ajustando-se a turbidez de acordo com o padrão 5 da escala de McFarland com a utilização de espectofotômetro (Spectrum- SP-1105). Inoculam-se 200 µl da suspensão nos tubos previamente preparados, e incubados a 25-30°C, durante, no máximo 28 dias, e iniciando- se a leitura a partir de 24-48 horas de incubação. A fermentação é revelada por formação de bolhas de gás, observadas dentro de tubos de Durhan conforme figura 4.54.

O teste de fermentação de carboidratos foi realizado em dois ensaios independentes.

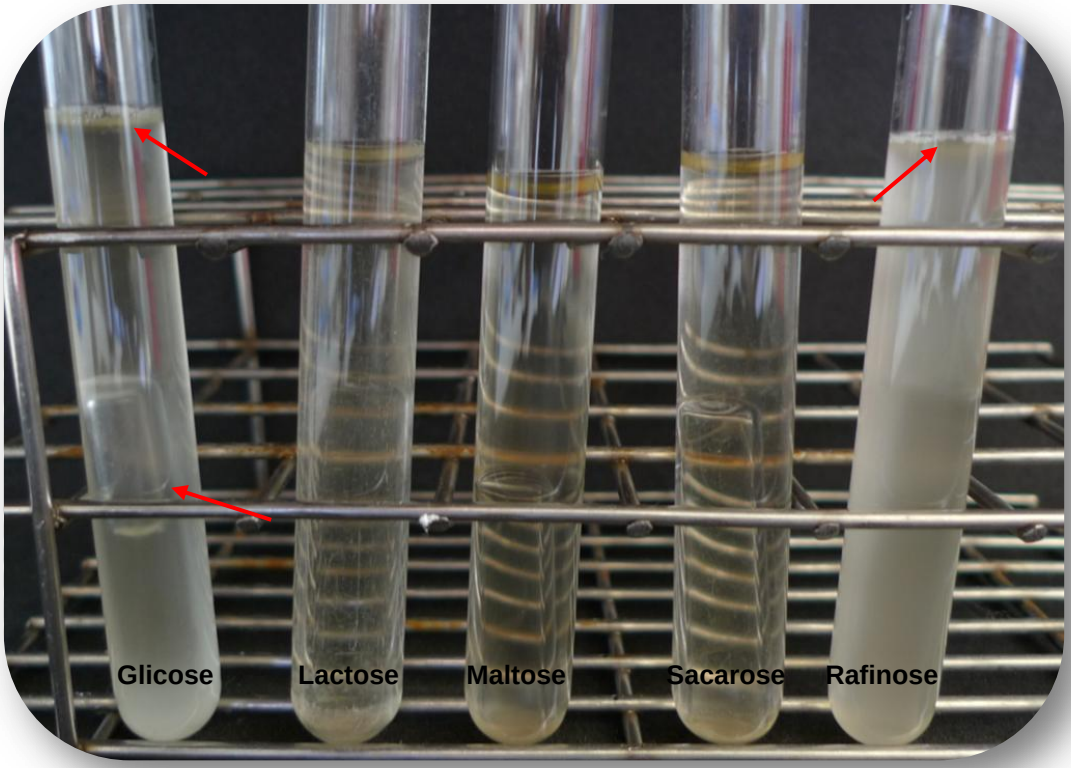

Figura 4.54 - Setas indicam a formação de gás

4.5.3.5 Diferenciação entre as espécies *C. albicans* e *C. dubliniensis*

Amostras que resultaram em colônias verdes após cultivo em meio CHROMagar *Candida*® foram submetidas a testes de temperatura a 45°C (167, 168) e teste de tolerância em caldo Sabouraud hipertônico (169) para diferenciação entre *C. albicans* e *C. dubliniensis*, em dois ensaios independentes.

4.5.3.5.1 Teste de temperatura a 45°C

Fenotipicamente, isolados de *C. dubliniensis* apresentam ótimo crescimento a temperatura de 30 a 37°C em meios de cultura usado comumentemente para crescimento de isolados do gênero *Candida* (171).

Diferentemente de *C. albicans,* isolados de *C. dubliniensis* apresentam pouco ou nenhum crescimento a temperatura de 42 ou 45°C por 48 horas (167, 168).

Após as amostras serem submetidas a crescimento prévio de 24 horas uma colônia foi retirada com o auxílio de uma alça de platina estéril e inoculada em placas de Petri estéreis contendo ASD com cloranfenicol. As placas foram incubadas a 45°C por 48 horas e as leituras foram feitas (Figura 4.55).

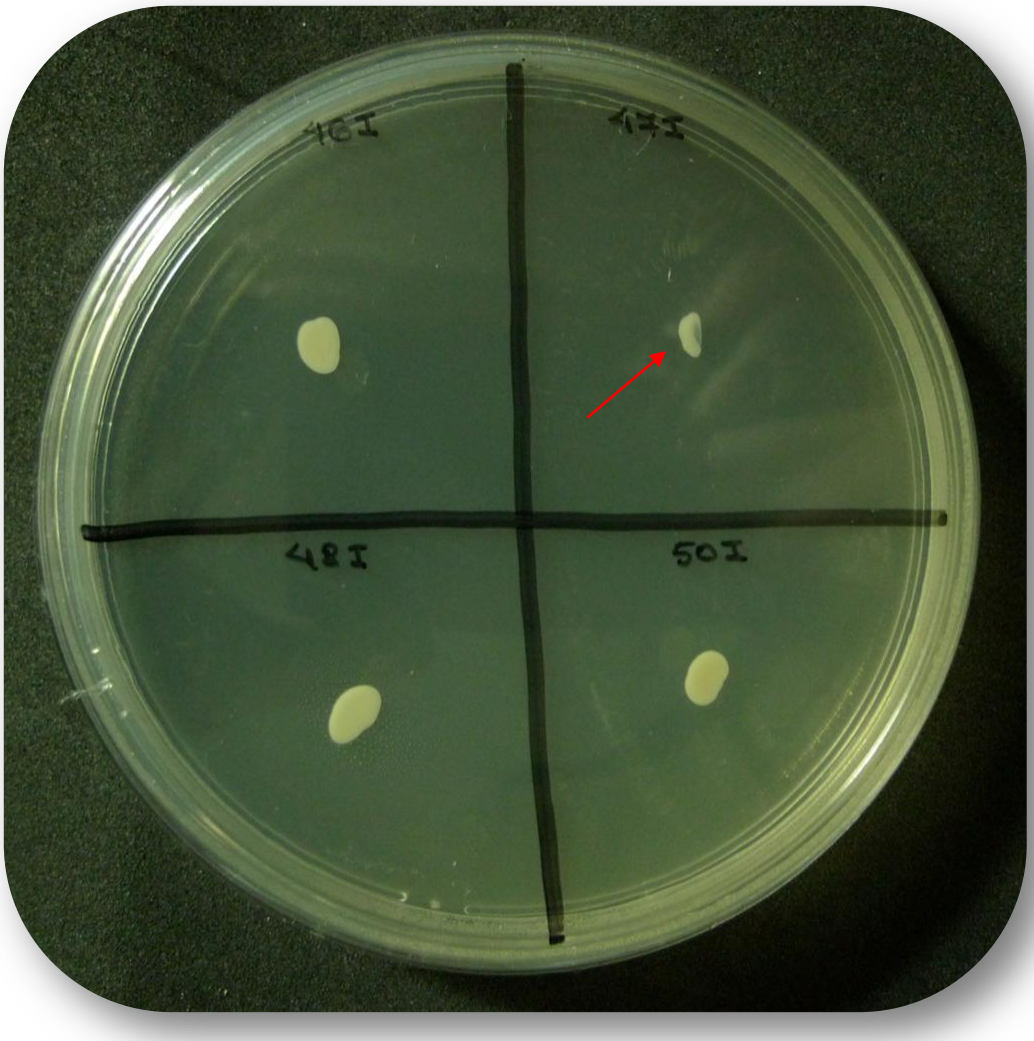

Figura 4.55 - Seta indica o não crescimento em meio ágar Sabouraud dextrose a 45°C

4.5.3.5.2 Teste de tolerância em caldo Sabouraud hipertônico

Este teste permite diferenciar *C. albicans* de C*. dubliniensis* baseando-se na capacidade de espécies de *C. dubliniensis* não crescerem em caldo Sabouraud acrescido de 6,5% de NaCl (169).

Culturas recentes das amostras (24 horas) foram preparadas em água destilada estéril, ajustando-se a turbidez de acordo com o padrão 5 da escala de McFarland. Inoculam-se 20 µl da suspensão nos tubos contendo 10 ml de caldo Sabouraud estéril acrescido de cloreto de sódio a 6,5%, e incubados a 37°C, durante 96 horas, e iniciando-se a leitura a partir de 24 horas de incubação. Amostra de *C. albicans* ATCC 10231 foi utilizada como controle positivo.

As leituras dos tubos foram realizadas observando-se o crescimento de *C. albicans* ou o não-crescimento de *C. dubliniensis*, conforme figura 4.56.

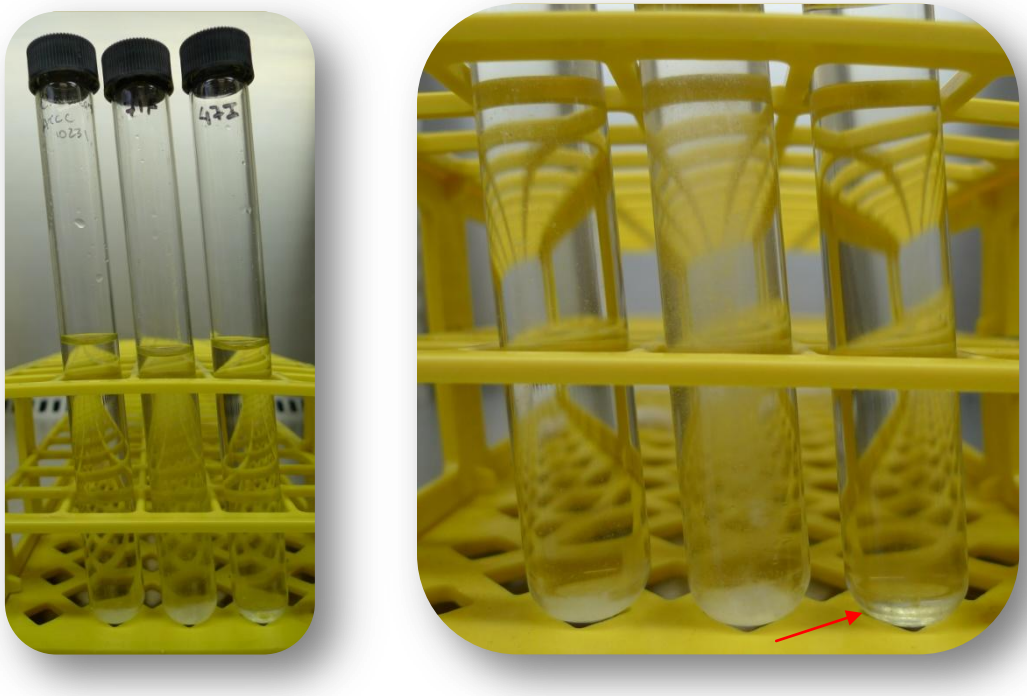

Figura 4.56 - Seta indica o não crescimento em caldo Sabouraud hipertônico

4.5.3.6 Sistema de identificação Api20® C Aux

Convencionalmente, a identificação das leveduras é baseada fundamentalmente nos testes de assimilação de carboidratos e nitrogênio e no teste de fermentação de carboidratos, em conjunto com as provas do tubo germinativo e microcultivo em lâmina. Inicialmente, utilizaram-se os testes de assimilação de carboidratos e nitrogênio de maneira convencional, isto é, utilizando-se a técnica auxanográfica na qual se emprega meio de ágar destituído de qualquer fonte de carbono (assimilação de carboidrato) ou composto nitrogenado (assimilação de nitrogênio). Neste meio é adicionada a suspensão da levedura por *pour plate*. A seguir, o açúcar é aliquotado sobre o meio solidificado contendo *Candida*, no caso da prova de assimilação de carboidratos, ou determinado composto nitrogenado, no caso da prova de assimilação de nitrogênio. Entretanto, estes testes apresentaram resultados imprecisos, não sendo possível obter resultados confiáveis para a identificação das espécies de leveduras. Por este motivo, optou-se por utilizar o sistema de identificação API 20C® Aux (bioMérieux, Basingstoke, UK) em substituição aos testes de assimilação de carboidratos e nitrogênio. O sistema API 20C® Aux possui 96-99% de acurácia em comparação com os testes de assimilação convencionais (172) e frequentemente é utilizado como método de referência para identificação de espécies de *Candida* (173).

Amostras que apresentaram coloração diferente de verde foram submetidas ao sistema de identificação de leveduras API 20C® Aux (bioMérieux, Basingstoke, UK). Preparou-se um inóculo com amostras submetidas a crescimento prévio de 24 horas. Com o auxílio de uma alça estéril coletou-se uma fração da colônia e fez-se uma suspensão de levedura de opacidade equivalente a 2 de McFarland, em salina estéril, através de espectofotômetro (Spectrum- SP-1105). Imediatamente, distribuiu-se 100 µl da suspensão anterior nas ampolas contendo o meio C, e homogeneizou-se com auxílio da pipeta evitando a formação de bolhas. Também com o auxílio de uma pipeta, preencheu- se as cúpulas com a suspensão obtida com o meio C de modo que não ficassem incompletas ou muito cheias, pois estes casos

podem causar resultados falsos positivos ou negativos. Fechou-se a caixa de incubação e incubou-se de 48-72 horas (± 6 horas) a 29°C ± 2°C (Figura 4.57).

Figura 4.57 - Galeria contendo cúpulas com meio C e seus respectivos açúcares

A leitura ocorreu após 48 horas, ou 72 horas, caso o teste, em especial a glicose, não fosse nítida a assimilação (visualmente pela turbidez) após as 48 horas. Observa-se o crescimento das leveduras comparando-as com a cúpula 0 que serve de parâmetro negativo e uma cúpula mais turva que o parâmetro 0 indica uma reação positiva (Figura 4.58). Juntamente com o resultado obtido, foi necessário determinar a presença de hifas (micélio) ou pseudohifas (pseudomicélio) através do teste de microcultivo realizado anteriormente com todas as amostras.

A identificação foi obtida a partir de um perfil numérico de 7 algarismos através do programa de identificação api*web*™ (https://apiweb.biomerieux.com/servlet/Identify).

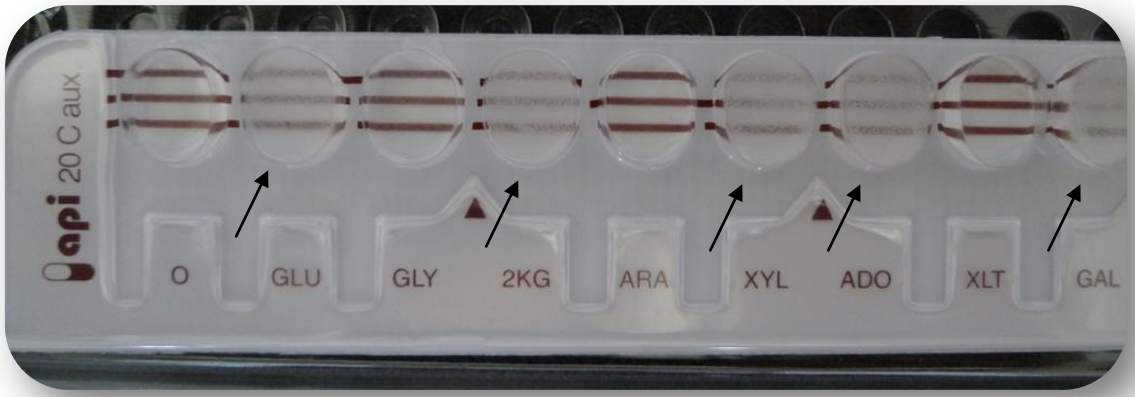

Figura 4.58 - Setas indicam cúpulas em que ocorreram a assimilação do açúcar pela levedura. Cúpula 0 representa o parâmetro para comparação

4.5.4 Avaliação das atividades enzimáticas

A avaliação das atividades enzimáticas foi conduzida nos tempos t_0 (inicial) e t_f (final) do experimento. Todas as amostras foram realizadas em duplicata, em dois ensaios independentes.

4.5.4.1 Preparo dos inóculos padrões de *Candida* sp., experimentos e controle, para os testes das atividades da fosfolipase e da proteinase

Após um período de 24 h de incubação das espécies de *Candida*, em meio ASD, foi feita uma suspensão da levedura em 10 ml de salina estéril e ajustando-se a turbidez de acordo com o padrão 5 da escala de McFarland através de espectofotômetro (Spectrum- SP-1105).

4.5.4.2. Determinação da atividade da fosfolipase

A atividade da fosfolipase foi mensurada a partir do tamanho da zona de precipitação ao redor das colônias após o crescimento das mesmas em meio ágar gema de ovo (174).

O meio ágar gema de ovo consiste em 13 g de ASD; 11,7 g de NaCl; 0,11 g de cloreto de cálcio ($CaCl_2$), e 10% de gema de ovo estéril, em 184 ml de água destilada. Primeiramente, todos os componentes, exceto a gema de ovo, foram homogeneizados e esterilizados. A gema de ovo foi centrifugada a 500 *g* por 10 min a temperatura ambiente, e 20 ml do *pellet* foram adicionados ao meio esterilizado.

Alíquota de 10 µl da suspensão de *Candida*, descrita anteriormente, foi inoculada na superfície de placas de Petri (90 mm de diâmetro) estéreis contendo o meio gema de ovo. As placas foram mantidas em temperatura ambiente para secagem do inoculo, e levadas para incubação a 37°C por 48 h. Após este período, foi mensurado o diâmetro da zona de precipitação ao redor da colônia (Figura 4.59).

A atividade da fosfolipase (valor P_Z) foi expressa a partir da razão do diâmetro da colônia pelo diâmetro da colônia mais a zona de precipitação (em mm), de acordo com metodologia descrita por Price et al. (174), os valores de P_Z foram interpretados de acordo com o quadro 4.1. Como controle positivo foi utilizado uma cepa de *C. albicans* ATCC 10231.

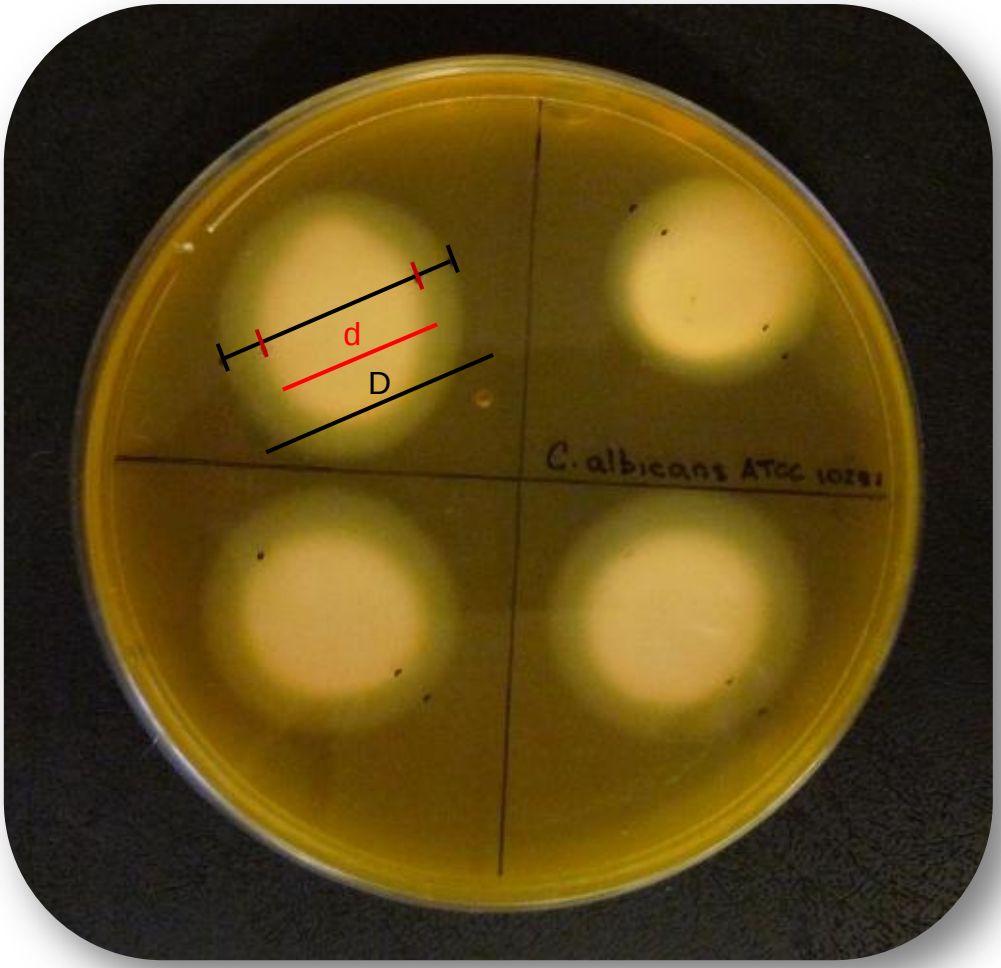

Figura 4.59 - P_Z= d/D (diâmetro da colônia/ diâmetro da zona de precipitação)

VALORES DE P_Z	CÓDIGO
$P_Z = 1$	1
$0,64 \leq P_Z \leq 0.99$	2
$P_Z < 0,64$	3

Quadro 4.1 - 1, negativo/sem atividade; 2, positivo; 3, fortemente positivo

4.5.4.3 Determinação da atividade da proteinase

A produção da proteinase foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Staib (175). O meio basal utilizando consiste em meio ágar contendo albumina bovina (BSA- fração V; Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., USA). Uma solução contendo 0,04 g de $MgSO_4$. $7H_2O$; 0,5 g de K_2PO_4; 1 g de NaCl; 0,2 g de extrato de levedura; 4 g de glicose e 0,5 g de albumina bovina foi preparada em volume de 60 ml. O pH foi ajustado em 3,5 com 1 M HCl. Em seguida, a solução foi esterilizada por filtração e homogeneizada a 140 ml de meio ágar estéril.

Alíquota de 10 µl da suspensão, descrita anteriormente, foi inoculada na superfície de placas de Petri (90 mm de diâmetro) estéreis contendo o meio. As placas foram mantidas em temperatura ambiente para secagem do inóculo, e levadas para incubação a 37°C por 48 horas. Após este período, foi mensurado o diâmetro da zona de precipitação ao redor da colônia (Figura 4.60).

A atividade da proteinase (valor PR_Z) foi expressa a partir da razão do diâmetro da colônia pelo diâmetro da colônia mais a zona de precipitação (em mm), de acordo com metodologia descrita por Price et al. (174). Os valores de Pr_Z foram interpretados da mesma forma que os valores de P_Z (Quadro 4.1). Como controle positivo foi utilizado uma cepa de *C. albicans* ATCC 10231.

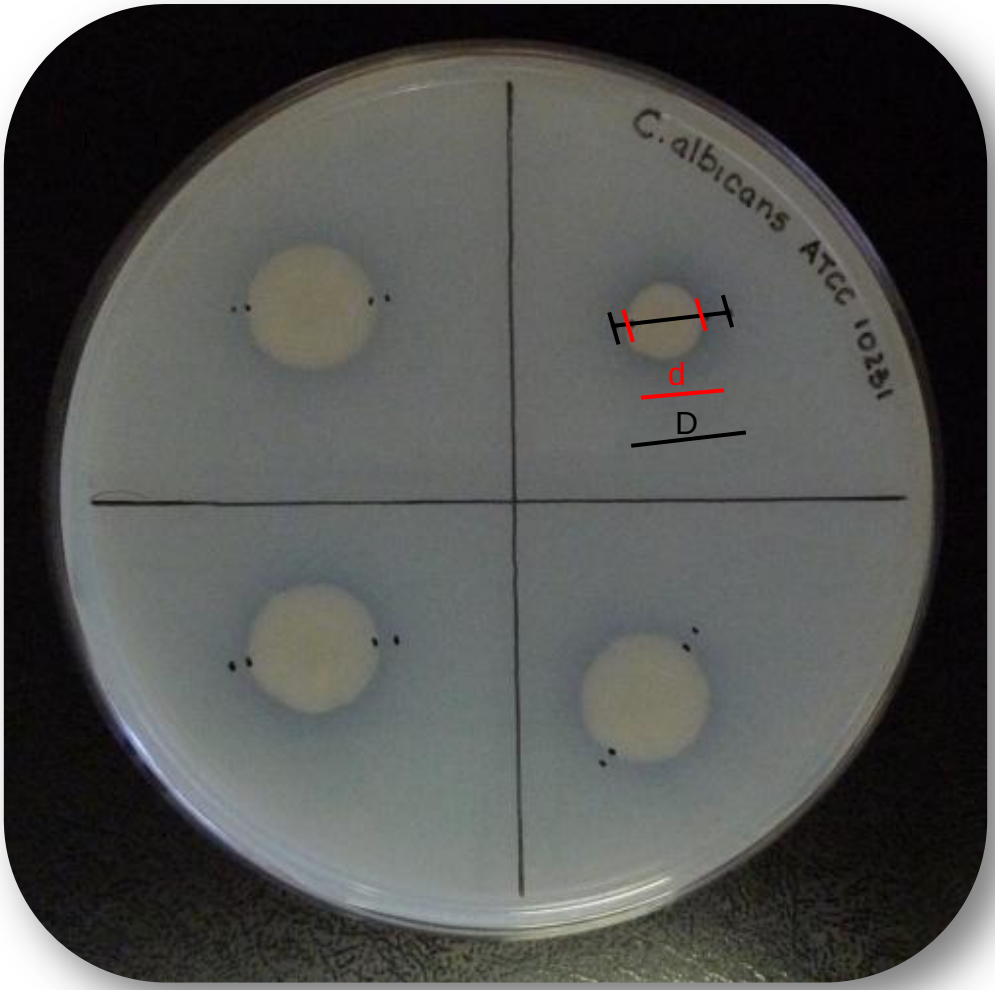

Figura 4.60 - PR $_Z$= d/D (diâmetro da colônia/ diâmetro da zona de precipitação)

4.6 VARIÁVEIS DO ESTUDO

- Grupos: experimental 1, experimental 2 e controle
- Etnia: leucoderma e melanoderma
- Sexo: feminino e masculino
- Problemas de saúde: ausente e presente
- Hipertensão: ausente e presente
- Diabetes: ausente e presente
- Colesterol: ausente e presente
- Problema cardíaco: ausente e presente

- Nível de triglicérides: ausente e presente
- Intolerância à lactose: ausente e presente
- Lesão na mucosa do palato: ausente e presente
- Tipo de prótese: bimaxilar (prótese superior e inferior) e unimaxilar (pelo menos a prótese superior)
- Idade do paciente (anos)
- Idade da prótese superior que estava utilizando no período da pesquisa (anos)
- Idade da prótese inferior que estava utilizando no período da pesquisa (anos)
- UFC t_0 : quantidade de UFC de *Candida* sp.antes do início do experimento
- UFC t_f : quantidade de UFC de *Candida* sp. após 8 semanas do experimento
- Espécies de *Candida: C. albicans; C. glabrata; C. tropicalis; C. krusei; C. dubliniensis, C. kefyr e C. famata*
- Fosfolipase (P_Z): sem atividade, atividade positiva e atividade fortemente positiva
- Proteinase (PR_Z): sem atividade, atividade positiva e atividade fortemente positiva

4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Foi feito o teste de aderência à distribuição normal pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Como nem todas as variáveis quantitativas tinham esta distribuição, optou-se pela realização de testes não paramétricos.

A comparação entre os grupos no início do experimento foi feita pelo teste de associação pelo qui-quadrado e Kruskal-Wallis, com nível descritivo estabelecido de $p < 0,05$.

A comparação das variáveis quantitativas antes e após o tratamento entre os grupos foi feita através de análise de variância com dois fatores sendo

um fator medida repetida (tempo) e o outro fator medida independente (grupo). As comparações múltiplas foram feitas pelo teste de Tukey HSD.

As análises estatísticas acima citadas foram realizadas utilizando-se o programa Statistical Package for Social Sciences (SPSS Inc., Chicago, USA) para Windows versão 15 e o nível descritivo estabelecido foi $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS DOS GRUPOS

Foram analisados 3 grupos a saber: experimental 1 (pacientes que ingeriram o queijo suplementado com *L. acidophilus* NCFM), experimental 2 (pacientes que ingeriram o queijo suplementado com *L. rhamnosus* Lr-32) e controle (pacientes que ingeriram o queijo sem suplementação probiótica). As comparações das características demográficas e clínicas estão nas tabelas 5.1 e 5.2. Observa-se que os resultados revelaram similaridade entre as 9 variáveis qualitativas (Tabela 5.1) e as 3 variáveis quantitativas (Tabela 5.2) avaliadas nos três grupos do experimento ($p > 0,05$). Nenhum paciente relatou ter problemas com relação ao nível de triglicérides e intolerância à lactose.

Tabela 5.1 - Características demográficas e clínicas das varáveis qualitativas dos pacientes de acordo com os grupos

Variável	Categoria	Grupos			*p* (χ2)
		Experimental 1	Experimental 2	Controle	
		Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)	
Etnia	Leucoderma	14 (73,7)	10 (50,0)	12 (60,0)	0,315
	Melanoderma	5 (26,3)	10 (50,0)	8 (40,0)	
Sexo	Feminino	15 (78,9)	17 (85,0)	17 (85,0)	0,846
	Masculino	4 (21,1)	3 (15,0)	3 (15,0)	
Problemas de saúde	Não	5 (26,3)	4 (20,0)	5 (25,0)	0,886
	Sim	14 (73,7)	16 (80,0)	15 (75,0)	
Hipertensão	Não	8 (42,1)	9 (45,0)	8 (40,0)	0,950
	Sim	11 (57,9)	11 (55,0)	12 (60,0)	
Diabetes	Não	13 (68,4)	15 (75,0)	17 (85,0)	0,471
	Sim	6 (31,6)	5 (25,0)	3 (15,0)	
Colesterol	Não	16 (84,2)	16 (80,0)	15 (75,0)	0,774
	Sim	3 (15,8)	4 (20,0)	5 (25,0)	
Problema cardíaco	Não	18 (94,7)	18 (90,0)	19 (95,0)	0,78
	Sim	1 (5,3)	2 (10,0)	1 (5,0)	
Lesão na mucosa do palato	Não	15 (78,9)	15 (75,0)	15 (75,0)	0,946
	Sim	4 (21,1)	5 (25,0)	5 (25,0)	
Tipo de prótese	Bimaxilar	13 (68,4)	13 (65,0)	19 (95,0)	0,052
	Unimaxilar	6 (31,6)	7 (35,0)	1 (5,0)	
TOTAL		**19 (100,0)**	**20 (100,0)**	**20 (100,0)**	

Tabela 5.2 - Características demográficas e clínicas das varáveis quantitativas dos pacientes de acordo com os grupos

Variável	Grupos			*p*
	Experimental 1	Experimental 2	Controle	
	média (dp)	média (dp)	média (dp)	
Idade	66,1 (11,6)	61,7 (14,1)	65,5 (10,5)	0,166
Idade da prótese superior	15,7 (12,9)	12,7 (11,2)	12,7 (9,4)	0,740
Idade da prótese inferior	9,6 (9,6)	11,2 (10,7)	10,5 (7,0)	0,751
UFC t_0 (log)	3,51 (0,41)	3,20 (0,51)	3,26 (0,49)	0,166
TOTAL	**19**	**20**	**20**	

5.2 DESCRIÇÃO E PREVALÊNCIA DE *CANDIDA* SP. NAS AMOSTRAS COLETADAS DOS PACIENTES ANTES DO INÍCIO DO EXPERIMENTO (t_0)

Após coleta das amostras bucais foi possível isolar e enumerar a quantidade de *Candida* sp. Os resultados referentes à enumeração das populações de *Candida* sp. bucais obtidos nos três grupos de pacientes deste estudo estão descritos na tabela 5.3.

As populações de *Candida* sp. bucais foram semelhantes entre os grupos, isto é, não diferiram entre si (p = 0,259).

Tabela 5.3 - Populações de *Candida* sp. nas amostras bucais coletas de pacientes pertencentes aos grupos da pesquisa, antes do início do experimento (t_0)

UFC *Candida* sp.	**Grupos**		
	Experimental 1	**Experimental 2**	**Controle**
	Nº pacientes (%)	**Nº pacientes (%)**	**Nº pacientes (%)**
2 log ≤ x< 3 log	2 (10,5)	6 (30,0)	6 (30,0)
3 log ≤ x	17 (89,5)	14 (70,0)	14 (70,0)
TOTAL	**19 (100,0)**	**20 (100,0)**	**20 (100,0)**

$p\ (\chi^2) = 0{,}259$

Verificou-se que 1 (5,3%) pessoa do grupo experimental 1, 1 (5,0%) pessoa do grupo experimental 2, e 2 (10,0%) pessoas do grupo controle apresentaram colonização mista por duas espécies diferentes de *Candida* (Figura 5.1). Os grupos não apresentaram diferença estatística entre si (p = 0,780). A combinação de espécies encontrada no grupo experimental 1 foi de *C. famata* e *C. tropicalis*, no grupo experimental 2 foi de *C. tropicalis* e *C. glabrata*, e no grupo controle foi de *C. albicans* e *C. kefyr*, e *C. glabrata* e *C. tropicalis*. Os demais pacientes colonizados por *Candida* sp. exibiram amostras com apenas uma espécie do micro-organismo.

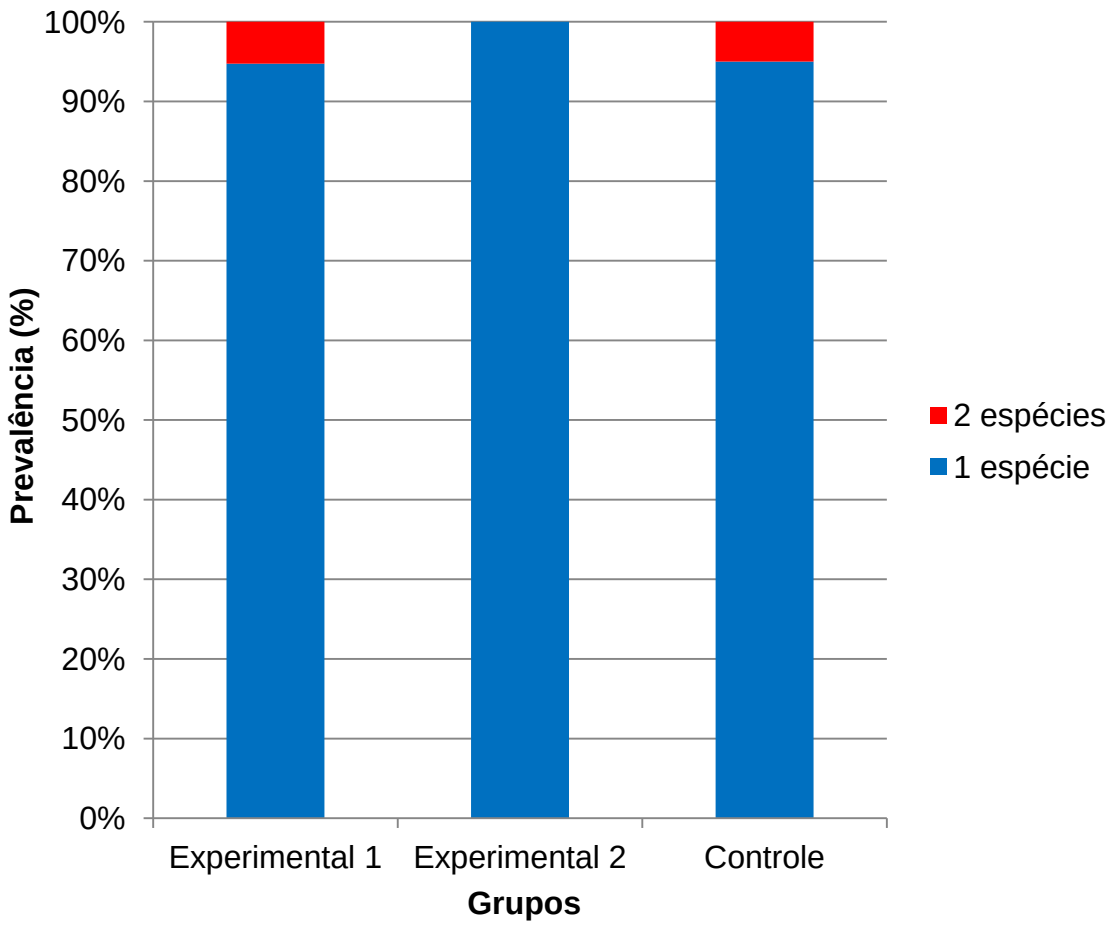

Figura 5.1 - Prevalência de pacientes que apresentaram colonização por uma única espécie ou por 2 espécies diferentes de *Candida* bucal, de acordo com os três grupos, antes do início do experimento (t_0)

A prevalência (valores expressos em porcentagem) dos isolados de *Candida* sp. identificados de acordo com os grupos da pesquisa está mostrada na figura 5.2. Ao todo foram isoladas 63 espécies de *Candida*: 20 espécies no grupo experimental 1, 21 espécies no grupo experimental 2 e 22 espécies no grupo controle. O isolado mais prevalente nos três grupos foi *C. albicans* com 60,0% no grupo experimental 1 e 66,7% no grupo experimental 2 e 68,2% no grupo controle.

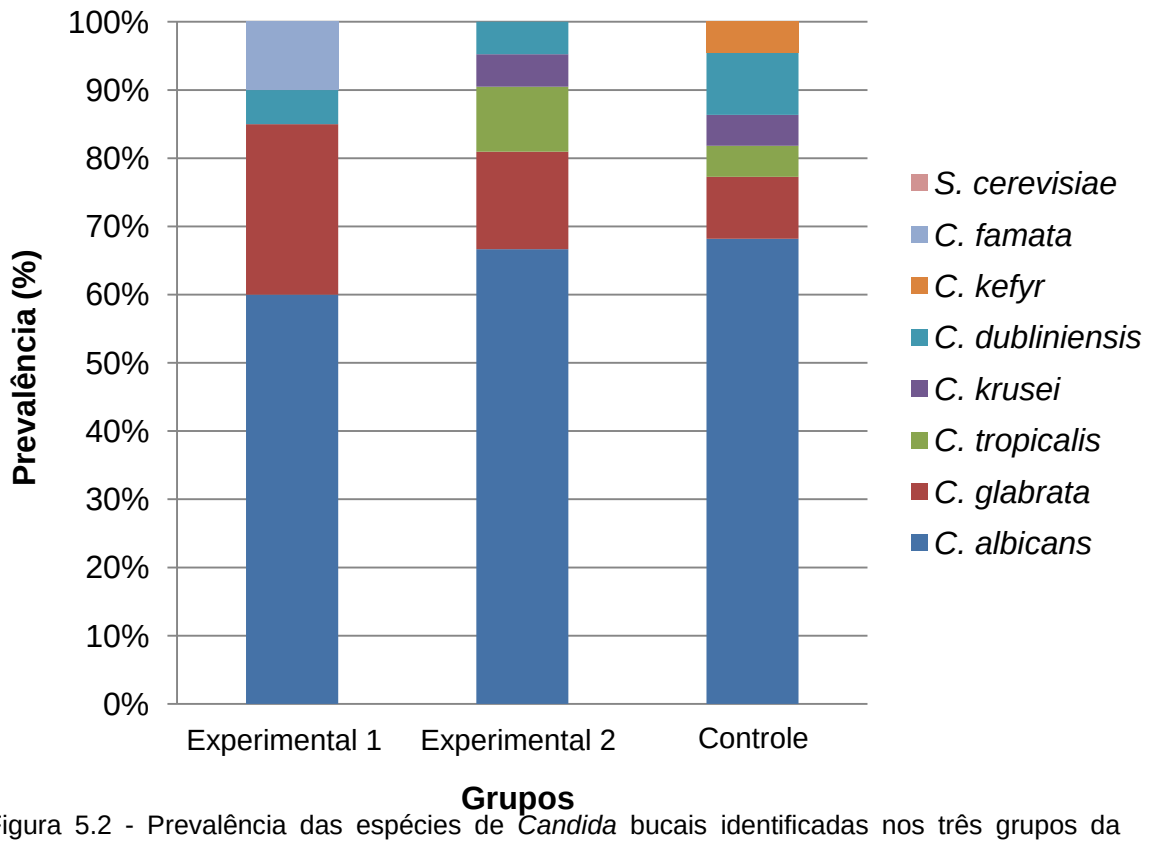

Figura 5.2 - Prevalência das espécies de *Candida* bucais identificadas nos três grupos da pesquisa: 20 espécies no grupo experimental 1, 21 espécies no grupo experimental 2 e 22 espécies no grupo controle, totalizando 63 espécies de *Candida*, antes do início do experimento (t_0)

Analisando a prevalência global dos isolados de *Candida* sp. observa-se que 65,1% (n=41) corresponde a *C. albicans*; 15,9% (n=10) a *C. glabrata*; 6,3% (n=4) a *C. dubliniensis*; 4,8% (n=3) a *C. tropicalis*; 3,2% (n=2) a *C. krusei* e *C. famata*, e 1,6% (n=1) a *C. kefyr* (Figura 5.3).

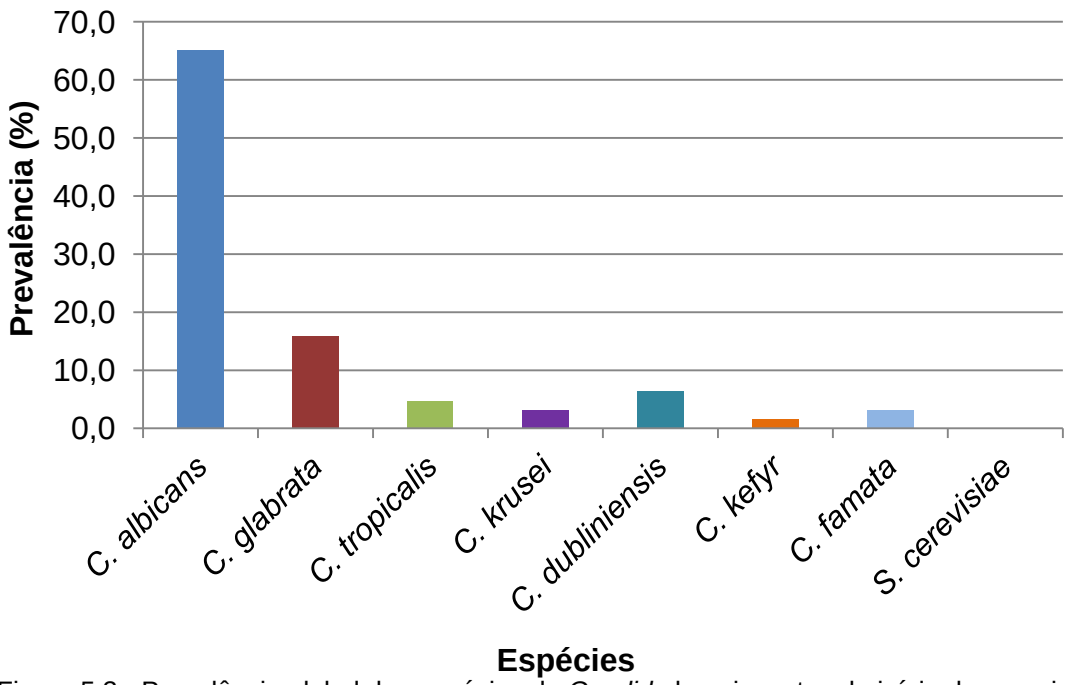

Figura 5.3 - Prevalência global das espécies de *Candida* bucais, antes do início do experimento (t_0)

5.3 DESCRIÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA FOSFOLIPASE E PROTEINASE NAS AMOSTRAS COLETADAS DOS PACIENTES ANTES DO INÍCIO DO EXPERIMENTO (t_0)

Com relação à produção das enzimas, fosfolipase e proteinase, pelos isolados de *Candida* sp., observa-se similaridade entre os três grupos (Tabela 5.4) ($p > 0,05$).

Tabela 5.4 - Valores quantitativos da produção de fosfolipase e proteinase pelos isolados de *Candida* sp., de acordo com os grupos, antes do início do experimento (t_0)

Produção enzimática	**Grupos**			***P***
	Experimental 1	**Experimental 2**	**Controle**	
	média (dp)	**média (dp)**	**média (dp)**	
Fosfolipase (P_Z)	0,79 (0,16)	0,73 (0,26)	0,86 (0,31)	0,425
Proteinase (PR_Z)	0,79 (0,18)	0,85 (0,17)	0,9 (0,30)	0,054
Total	**19**	**20**	**20**	

5.3.1 Atividade da fosfolipase

O número absoluto e a prevalência geral (expressa em porcentagem) de pessoas nos quais seus isolados de *Candida* sp. das amostras coletadas dos pacientes antes do início do experimento (t_i) que não produziram fosfolipase no grupo experimental 1 e 2, e no grupo controle foram, respectivamente,5 (26,3%), 6 (30,0%) e 8 (40,0%) (Tabela 5.5), sem diferença entre os grupos (*p* = 0,053).

Tabela 5.5 - Número de pessoas colonizadas por espécies de *Candida* que apresentaram atividade de produção de fosfolipase, de acordo com cada grupo, antes do início do experimento (t_0)

Produção Fosfolipase	**Grupos**		
	Experimental 1	**Experimental 2**	**Controle**
	Nº pessoa (%)	**Nº pessoa (%)**	**Nº pessoa (%)**
$P_Z < 0,64$ [a]	1 (5,3)	5 (40,0)	4 (20,0)
$0,64 \leq P_Z \leq 0,99$ [b]	13 (68,4)	6 (30,0)	8 (40,0)
$P_Z = 1$ [c]	5 (26,3)	6 (30,0)	8 (40,0)
TOTAL	**19 (100,0)**	**20 (100,0)**	**20 (100,0)**

p ($\chi 2$)= 0,053, onde [a] atividade fortemente positiva, [b] atividade positiva e [c] sem atividade.

De acordo com os grupos da pesquisa, as pessoas que possuíam colonização pelas espécies de *C. albicans; C. glabrata; C. tropicalis, C. krusei e C. dubliniensis* e que produziam fosfolipase foram semelhantes entre si (*p*> 0,05). Para as espécies *C. kefyr* e *C. famata* não foi possível fazer o teste estatístico devido à pouca ocorrência de casos nos grupos da pesquisa, pois *C. kefyr* foi isolado das amostras dos pacientes somente no grupo controle, e *C. famata* foi isolado somente no grupo experimental 1 (Tabela 5.6).

Tabela 5.6 - Número de pessoas colonizadas por espécies de *Candida* que produzem e não produzem fosfolipase, de acordo com os grupos da pesquisa, antes do início do experimento (t_0)

Espécie de *Candida*	**Fosfolipase**	**Grupos**			***p* (χ^2)**
		Experimental 1	**Experimental 2**	**Controle**	
		Nº pessoa (%)	**Nº pessoa (%)**	**Nº pessoa (%)**	
C. albicans	Produz	9 (47,0)	11 (55,0)	10 (50,0)	0,888
	não produz	10 (53,0)	3 (7,3)	5 (12,2)	
C. glabrata	Produz	3 (16,0)	2 (10,0)	0 (0,0)	0,200
	não produz	16 (84,0)	18 (90,0)	20 (100,0)	
C. tropicalis	Produz	0 (0,0)	2 (10,0)	1 (5,0)	0,364
	não produz	19 (100,0)	18 (90,0)	19 (95,0)	
C. krusei	Produz	0 (0,0)	1 (5,0)	1 (5,0)	0,611
	não produz	19 (100,0)	19 (95,0)	19 (95,0)	
C. dubliniensis	produz	1 (5,0)	0 (0,0)	2 (10,0)	0,355
	não produz	18 (95,0)	20 (100,0)	18 (90,0)	
C. kefyr	produz	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (5,0)	*
	não produz	19 (100,0)	20 (100,0)	19 (95,0)	
C. famata	produz	2 (11,0)	0	0	*
	não produz	17 (89,0)	20 (100,0)	20 (100,0)	
TOTAL		**19 (100,0)**	**20 (100,0)**	**20 (100,0)**	

***** impossível fazer o teste estatístico, pois há poucos casos.

5.3.2 Atividade da proteinase

O número absoluto e a prevalência geral (expressa em porcentagem) de pessoas nos quais seus isolados de *Candida* sp. das amostras coletadas dos pacientes antes do início do experimento (t_i) que não produziram proteinase no grupo experimental 1 e 2, e no grupo controle foram, respectivamente, 2 (10,5%), 4 (20,0%) e 3 pessoas (30,0%) (Tabela 5.7). Em nenhum dos grupos foi observada atividade de produção da proteinase fortemente positiva. Não houve diferença significativa entre os grupos (*p* = 0,319).

Tabela 5.7 - Número de pessoas colonizadas por espécies de *Candida* que apresentaram atividade de produção de proteinase, de acordo com cada grupo, antes do início do experimento (t_0)

Produção Proteinase	**Grupos**		
	Experimental 1	**Experimental 2**	**Controle**
	Nº pessoa (%)	**Nº pessoa (%)**	**Nº pessoa (%)**
$P_Z < 0,64$ [a]	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
$0,64 \leq P_Z \leq 0,99$ [b]	17 (89,5)	16 (80,0)	14 (70,)
$PR_Z = 1$ [c]	2 (10,5)	4 (20,0)	3 (30,0)
TOTAL	**19 (100,0)**	**20 (100,0)**	**20 (100,0)**

p= 0,319, onde [a] atividade fortemente positiva, [b] atividade positiva e [c] sem atividade.

De acordo com os grupos da pesquisa, as pessoas que possuíam colonização pelas espécies de *C. albicans; C. glabrata; C. tropicalis, C. krusei e C. dubliniensis* e que produziam proteinase foram semelhantes entre si (*p*> 0,05). No único isolado de *C. kefyr* do paciente do grupo controle não foi detectada a produção de proteinase. Não foi possível realizar o teste estatístico com *C. famata* devido à pouca ocorrência de caso, somente 2 pessoas do grupo experimental 1 apresentou colonização por *C. famata* (Tabela 5.8).

Tabela 5.8 - Número de pessoas colonizadas por espécies de *Candida* que produzem e não produzem proteinase, de acordo com os grupos da pesquisa, antes do início do experimento (t_0)

Espécie de *Candida*	**Proteinase**	**Grupos**			***p* (χ^2)**
		Experimental 1	**Experimental 2**	**Controle**	
		Nº pessoa (%)	**Nº pessoa (%)**	**Nº pessoa (%)**	
C. albicans	produz	11 (57,9)	11 (55,0)	12 (60,0)	0,950
	não produz	8 (42,1)	9 (45,0)	8 (40,0)	
C. glabrata	produz	5 (26,3)	3 (15,0)	2 (10,0)	0,382
	não produz	14 (73,7)	17 (85,0)	18 (90,0)	
C. tropicalis	produz	0 (0,0)	2 (10,0)	1 (5,0)	0,364
	não produz	19 (100,0)	18 (90,0)0	19 (95,0)	
C. krusei	produz	0 (0,0)	1 (5,0)	1 (5,0)	0,612
	não produz	19 (100,0)	19 (95,0)	19 (95,0)	
C. dubliniensis	produz	1 (11,1)	1 (5,0)	1 (5,0)	0,999
	não produz	18 (88,9)	19 (95,0)	19 (95,0)	
C. kefyr	produz	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	*
	não produz	19 (100,0)	20 (100,0)	20 (100,00)	
C. famata	produz	2 (10,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	*
	não produz	17 (89,5)	20 (100,0)	20 (100,0)	
TOTAL		**19 (100,0)**	**20 (100,0)**	**20 (100,0)**	

***** impossível fazer o teste estatístico, pois há poucos casos.

5.4 REDUÇÃO DE *CANDIDA* SP. NAS AMOSTRAS COLETADAS APÓS A INGESTÃO DOS QUEIJOS (t_f)

Foi observada diferença estatística na redução de *Candida* sp. entre as amostras coletadas antes do início do experimento (t_0) e após 8 semanas de ingestão dos queijos (t_f) nos grupos experimental 1 e 2 ($p < 0,05$), enquanto que no grupo controle essa diferença não foi observada ($p > 0,05$) (Figura 5.4).

Quando comparado a quantidade de redução de *Candida* sp. entre os grupos experimentais não foi observado diferença estatística ($p > 0,05$).

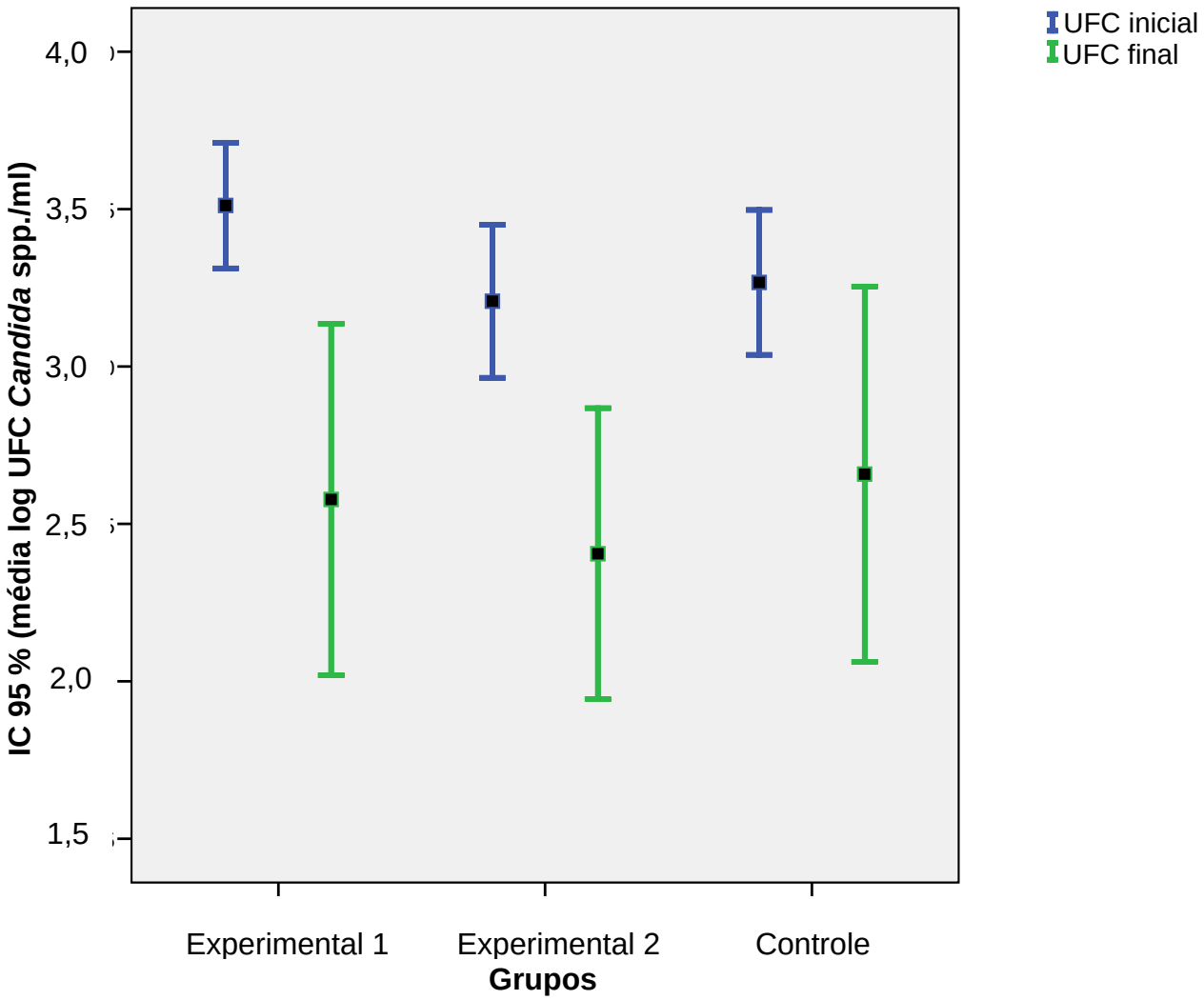

Figura 5.4 - Redução da enumeração de *Candida* sp. nos três grupos do experimento após ingestão diária dos queijos por 8 semanas

5.5 DESCRIÇÃO E PREVALÊNCIA DE *CANDIDA* SP. NAS AMOSTRAS COLETADAS DOS PACIENTES APÓS 8 SEMANAS DE INGESTÃO DIÁRIA DO QUEIJO MINAS FRESCAL (t_f)

De acordo com a tabela 5.9, observa-se que após as 8 semanas de ingestão do queijo minas frescal, 11 (55,0%) pessoas apresentaram populações de *Candida* sp. entre 3 log ≤ x< 4 log, enquanto que no grupo

experimental 1 e 2 esses números foram de 8 (40,0%) e 7 (36,9%). Níveis acima de 4 log foram observadas somente em 1 (5,3%) pessoa do grupo experimental 1 e 1 (5,0%) pessoa do grupo controle.

Tabela 5.9 - Populações de *Candida* sp. nas amostras bucais coletas de pacientes pertencentes aos grupos da pesquisa, após 8 semanas de ingestão do queijo minas frescal (t_f)

UFC *Candida* sp.	**Grupos**		
	Experimental 1	**Experimental 2**	**Controle**
	Nº paciente (%)	**Nº paciente (%)**	**Nº paciente (%)**
0	2 (10,45)	2 (10,0)	3 (15,0)
1 log ≤ x< 2 log	2 (10,45)	4 (20,0)	2 (10,0)
2 log ≤ x< 3 log	7 (36,9)	6 (30,0)	3 (15,0)
3 log ≤ x< 4 log	7 (36,9)	8 (40,0)	11 (55,0)
4 log	1 (5,3)	0 (0,0)	1 (5,0)
TOTAL	**19 (100,0)**	**20 (100,0)**	**20 (100,0)**

Dos pacientes do grupo experimental 1 (n=19), em 2 (10,4%) pacientes não foi observado nenhum crescimento de colônias de *Candida* sp. No grupo experimental 2 e controle, observou-se a mesma situação em 2 (10,0%) e 3 (15,0%) pacientes, respectivamente (Tabela 5.10). Não foi observada diferença estatística (*p*= 0,866).

Tabela 5.10 - Presença e ausência de isolados de *Candida* sp. nas amostras coletadas dos pacientes após 8 semanas de ingestão do queijo minas frescal (t_f), de acordo com os grupos da pesquisa

***Candida* sp.**	**Grupos**		
	Experimental 1	**Experimental 2**	**Controle**
	Nº pacientes (%)	**Nº pacientes (%)**	**Nº pacientes (%)**
Presente	17 (89,6)	18 (90,0)	17 (85,0)
Ausente	2 (10,4)	2 (10,0)	3 (15,0)
TOTAL	**19 (100,0)**	**20 (100,0)**	**20 (100,0)**

$p\ (\chi^2) = 0{,}866$

Os isolados de *Candida* sp. identificados nas amostras coletadas após 8 semanas do experimento mostraram que 1 (5,3%) pessoa do grupo experimental 1 e 1 (5,0 %) pessoa do grupo controle apresentou colonização mista por duas espécies diferentes de *Candida* (Figura 5.5). No grupo experimental 2 não foi verificado colonização mista (p= 0,588).

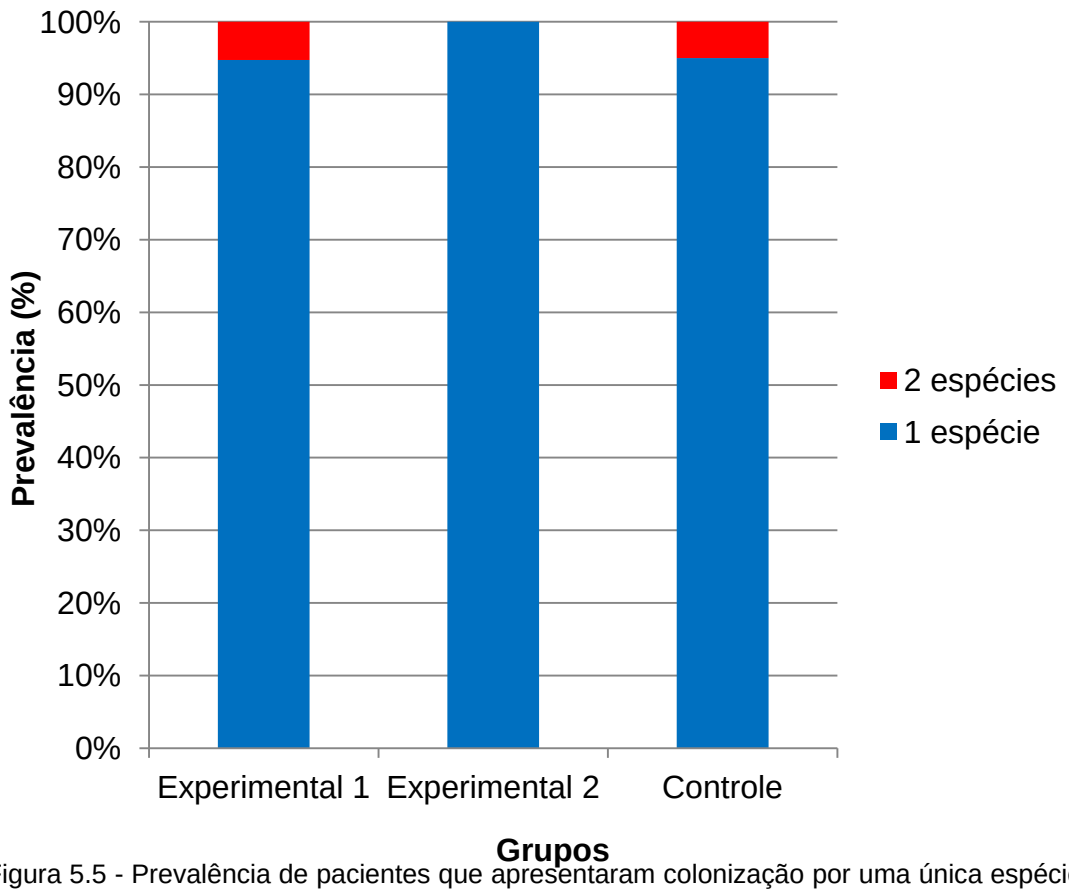

Figura 5.5 - Prevalência de pacientes que apresentaram colonização por uma única espécie ou por 2 espécies diferentes de *Candida* bucal, de acordo com os grupos, após 8 semanas do experimento (t_f)

A combinação de espécies encontrada no grupo experimental 1 foi de *C. glabrata* e *C. tropicalis* e no grupo controle foi de *C. albicans* e *C. glabrata*. Os demais pacientes colonizados por *Candida* sp. exibiram amostras com apenas uma espécie do micro-organismo.

A prevalência (expressa em porcentagem) dos isolados de *Candida* sp. identificados de acordo com os grupos da pesquisa está mostrada na figura 5.6. Ao todo foram isoladas 54 espécies de *Candida*, havendo 18 isolados em cada grupo. A espécie mais prevalente nos três grupos foi *C. albicans* com 61,1% no grupo experimental 1 e controle, e 72,2% nos grupos experimental 2. Observou-se o isolamento da levedura *S. cerevisiae* em 1 (5,6%) pessoa do grupo experimental 1.

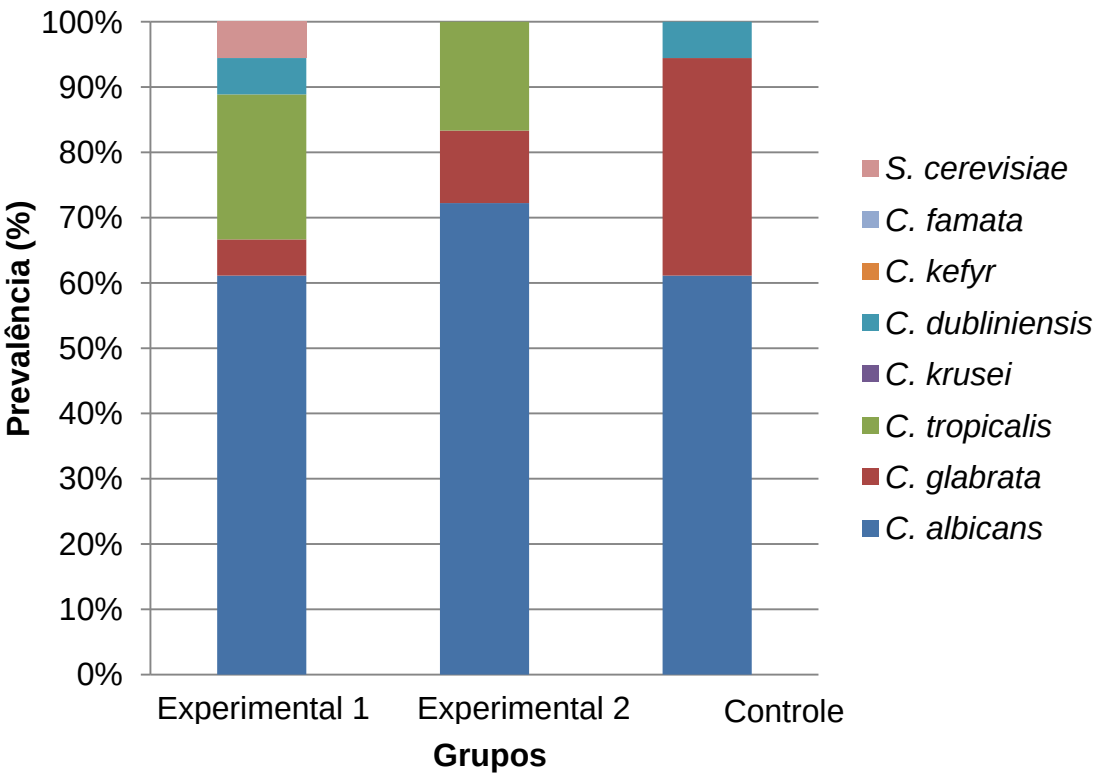

Figura 5.6 - Prevalência das espécies de *Candida* bucais identificadas de acordo com os grupos da pesquisa: 18 espécies em cada grupo da pesquisa, totalizando 54 espécies de *Candida*, após 8 semanas do experimento (t_f)

Analisando a prevalência global das espécies isoladas de *Candida* observa-se que 64,8% (n=35) corresponde a *C. albicans*; 16,7% (n=9) a *C. glabrata*, 13,0% (n=7) a *C. tropicalis,* e 3,7% (n=2) a *C. dubliniensis*. Não foi isolada nenhuma espécie de *C. krusei*, *C. kefyr* e *C. famata*. (Figura 5.7).

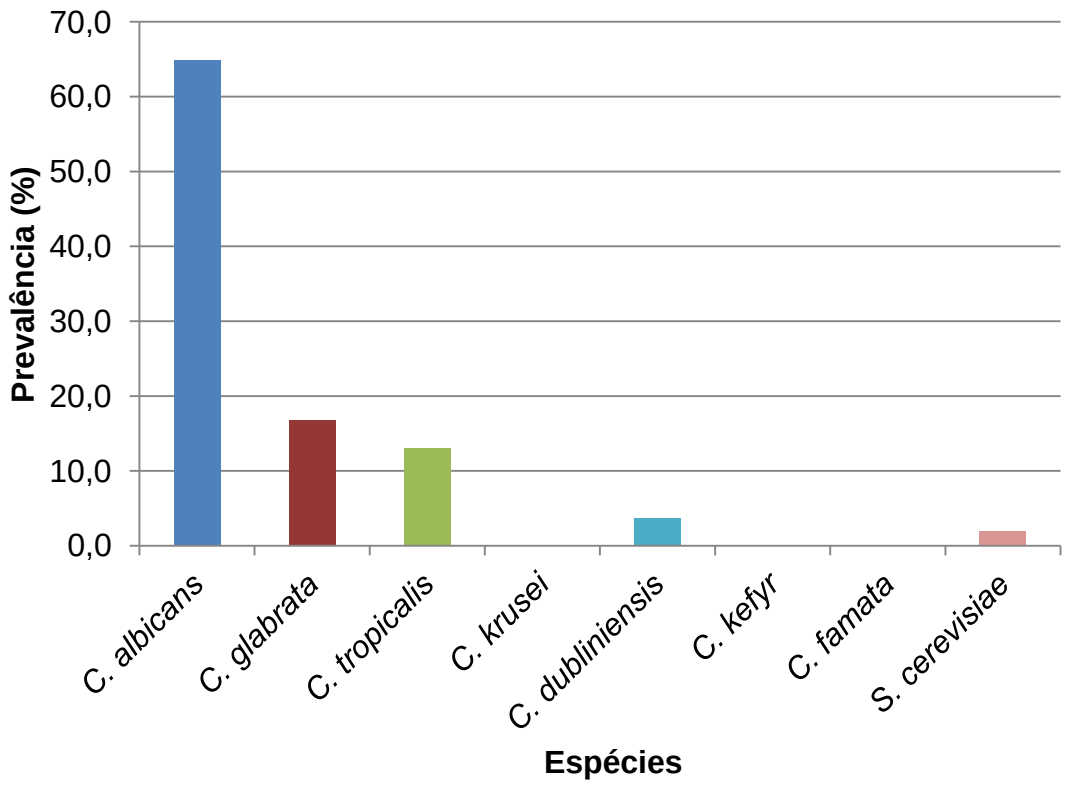

Figura 5.7 - Prevalência global das espécies de *Candida* bucais, após 8 semanas do experimento (t_f)

5.6 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DOS ISOLADOS DE *CANDIDA* SP. APÓS O EXPERIMENTO (t_f)

Com relação à atividade enzimática da fosfolipase e da proteinase dos isolados de *Candida* sp., observa-se similaridade entre os três grupos (Tabela 5.11) ($p > 0,05$).

Tabela 5.11 - Valores quantitativos da fosfolipase e da proteinase, produzidas pelos isolados de *Candida* sp., de acordo com cada grupo, após 8 semanas de ingestão do queijo minas frescal pelos participantes da pesquisa (t_f)

Atividade enzimática	**Grupos**			
	Experimental 1	**Experimental 2**	**Controle**	***p***
	média (dp)	**média (dp)**	**média (dp)**	
Fosfolipase (P_Z)	0,64 (0,29)	0,59 (0,26)	0,68 (0,38)	0,369
Proteinase (PR_Z)	0,75 (0,36)	0,72 (0,26)	0,71 (0,32)	0,972
TOTAL	**19**	**20**	**20**	

5.6.1 Atividade da fosfolipase

O número absoluto e a prevalência geral (expressa em porcentagem) de pessoas nos quais seus isolados de *Candida* sp. das amostras coletadas após 8 semanas do experimento (t_f) que não produziram fosfolipase no grupo experimental 1 e 2, e no grupo controle foram, respectivamente, 2 (10,6%), 2 (10,0%) e 4 (20,0%) (Tabela 5.12). Não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos (p= 0,597).

Tabela 5.12 - Número de pessoas colonizadas por espécies de *Candida* sp. que apresentaram atividade de produção de fosfolipase, de acordo com cada grupo, após 8 semanas de ingestão do queijo minas frescal (t_f)

Produção Fosfolipase	**Grupos**		
	Experimental 1	**Experimental 2**	**Controle**
	Nº pessoa (%)	**Nº pessoa (%)**	**Nº pessoa (%)**
$P_Z < 0,64$ [a]	7 (36,8)	11 (55,0)	7 (35,0)
$0,64 \leq P_Z \leq 0,99$ [b]	10 (52,6)	7 (35,0)	9 (45,0)
$P_Z = 1$ [c]	2 (10,6)	2 (10,0)	4 (20,0)
TOTAL	**19 (100,0)**	**20 (100,0)**	**20 (100,0)**

p (χ 2)= 0,597, onde [a] atividade fortemente positiva, [b] atividade positiva e [c] sem atividade.

De acordo com os grupos da pesquisa, as pessoas que possuíam colonização pelas espécies de *C. albicans, C. glabrata* e *C. tropicalis,* e que produziam fosfolipase foram semelhantes entre si (*p*> 0,05). Para as espécies *C. dubliniensis* não foi possível fazer o teste estatístico devido a pouca ocorrência de casos nos grupos da pesquisa, isto é, das 2 pessoas que possuíam colonização por *C. dubliniensis*, observou-se somente uma pessoa do grupo experimental 1 que produziu fosfolipase (Tabela 5.13).

Tabela 5.13 - Número de pessoas colonizadas por espécies de *Candida* que produzem e não produzem fosfolipase, de acordo com cada grupo após 8 semanas de ingestão do queijo minas frescal pelos participantes da pesquisa (t_f)

Espécie de *Candida*	**Fosfolipase**	**Grupos**			***p* (χ^2)**
		Experimental 1	**Experimental 2**	**Controle**	
		Nº pessoa (%)	**Nº pessoa (%)**	**Nº pessoa (%)**	
C. albicans	produz	10 (52,6)	12 (60,0)	11 (55,0)	0,893
	não produz	9 (47,4)	8 (40,0)	9 (45,0)	
C. glabrata	produz	1 (5,2)	1 (5,0)	3 (15,0)	0,436
	não produz	18 (94,8)	19 (95,0)	17 (85,0)	
C. tropicalis	produz	4 (21,1)	3 (15,0)	0 (0,0)	0,11
	não produz	15 (88,9)	17 (85,0)	20 (100,0)	
C. dubliniensis	produz	1 (5,2)	0 (0,0)	0 (0,0)	*
	não produz	18 (94,8)	20 (100,0)	20 (100,0)	
TOTAL		**19 (100,0)**	**20 (100,0)**	**20 (100,0)**	

***** impossível fazer o teste estatístico, pois há poucos casos.

Não foi observada diferença estatística na produção de fosfolipase (índice P_Z) pelos isolados de *Candida* sp. entre as amostras coletadas antes do início do experimento (t_0) e após 8 semanas de ingestão dos queijos (t_f) pelos participantes da pesquisa ($p > 0,05$) (Figura 5.8).

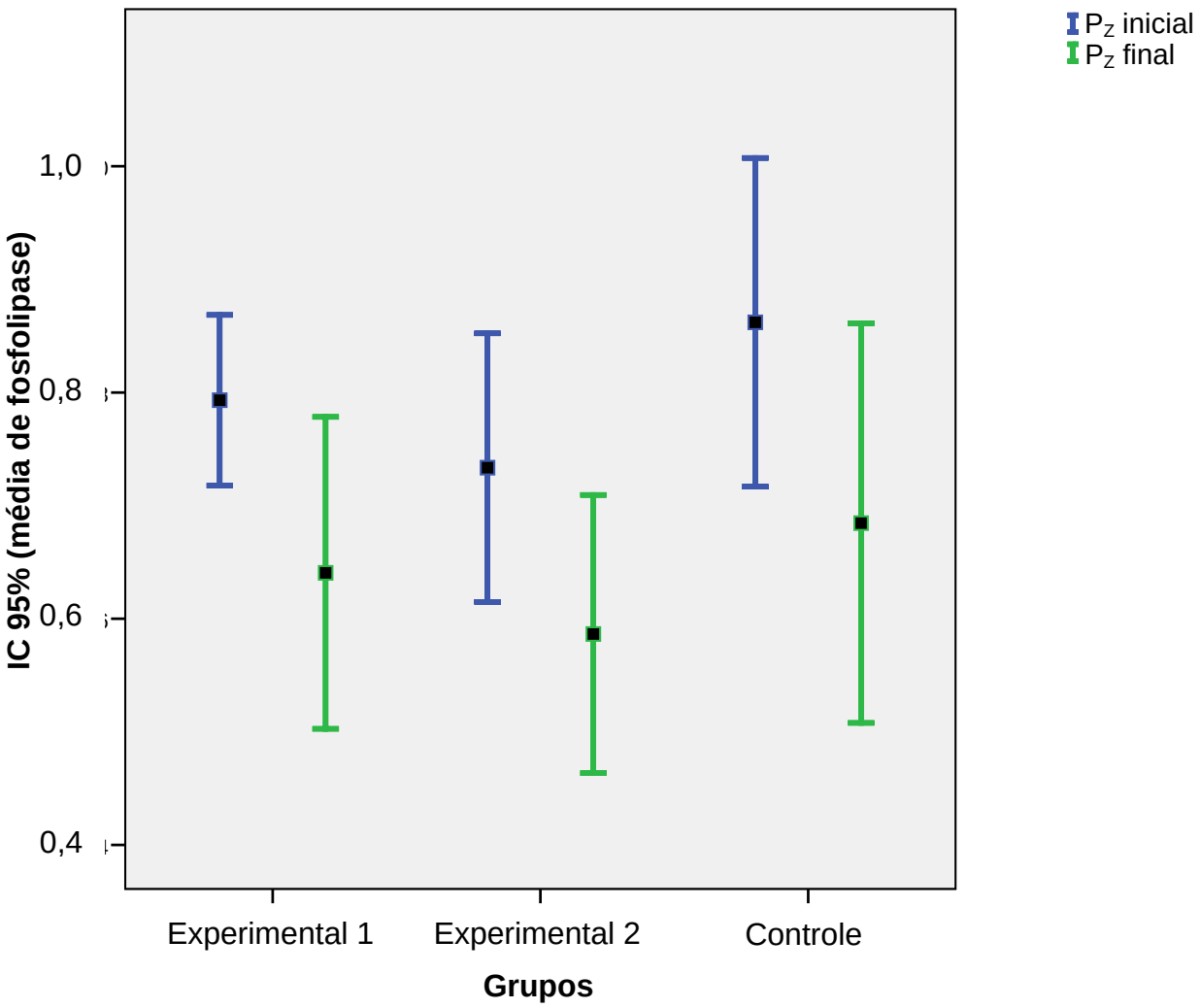

Figura 5.8 - Redução dos índices P_Z de fosfolipase produzidos pelos isolados de *Candida* sp nos três grupos do experimento após ingestão diária dos queijos por 8 semanas (t_f)

5.6.2 Atividade da proteinase

O número absoluto e a prevalência geral (expressa em porcentagem) de pessoas nos quais seus isolados de *Candida* sp. das amostras coletadas após 8 semanas do experimento (t_f) que não produziram proteinase foi 3 (16,0%) no grupo experimental 1,3 (15,0%) nos grupos experimental 2 e controle (Tabela 5.14). Somente em 1 pessoa do grupo experimental 1 foi observada atividade de produção da proteinase fortemente positiva. Os grupos não apresentaram diferença estatisticamente significante (p= 0,962).

Tabela 5.14 - Número de pessoas colonizadas por espécies de *Candida* sp. que apresentaram atividade de produção de proteinase, de acordo com cada grupo, após 8 semanas de ingestão do queijo minas frescal (t_f)

Produção Proteinase	**Grupos**		
	Experimental 1	**Experimental 2**	**Controle**
	Nº pessoa (%)	**Nº pessoa (%)**	**Nº pessoa (%)**
$P_Z < 0,64$ [a]	1 (5,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
$0,64 \leq P_Z \leq 0,99$ [b]	15 (79,0)	17 (85,0)	17 (85,0)
$PR_Z = 1$ [c]	3 (16,0)	3 (15,0)	3 (15,0)
TOTAL	**19 (100,00)**	**20 (100,00)**	**20 (100,00)**

p (χ 2)= 0,962, onde [a] atividade fortemente positiva, [b] atividade positiva e [c] sem atividade.

De acordo com os grupos da pesquisa, as pessoas que possuíam colonização pelas espécies de *C. albicans, C. glabrata* e *C. tropicalis,* e que produziam proteinase foram semelhantes entre si ($p > 0,05$). Para a espécie *C. dubliniensis* não foi possível fazer o teste estatístico devido à pouca ocorrência de casos nos grupos da pesquisa, isto é, observou-se somente uma pessoa com colonização por *C. dubliniensis* que produziu proteinase no grupo experimental 1 (Tabela 5.15).

Tabela 5.15 - Número de pessoas colonizadas por espécies de *Candida* que produzem e não produzem proteinase, de acordo com cada grupo após 8 semanas de ingestão do queijo minas frescal pelos participantes da pesquisa (t_f)

Espécie de *Candida*	**Proteinase**	**Grupos**			***p* (χ^2)**
		Experimental 1	**Experimental 2**	**Controle**	
		Nº pessoas (%)	**Nº pessoas (%)**	**Nº pessoas (%)**	
C. albicans	Produz	9 (47,4)	11 (55,0)	9 (45,0)	0,804
	não produz	10 (52,6)	9 (45,0)	11(55,0)	
C. glabrata	Produz	0 (0,0)	2 (10,0)	6 (30,0)	0,075
	não produz	19 (100,0)	18 (90,0)	14 (70,0)	
C. tropicalis	Produz	4 (21,1)	2 (10,0)	0 (0,0)	0,094
	não produz	15 (88,9)	18 (90,0)	20 (100,0)	
C. dubliniensis	Produz	1 (5,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	*
	não produz	18 (94,7)	20 (100,0)	20 (100,0)	
TOTAL		**19 (100,0)**	**20 (100,0)**	**20 (100,0)**	

***** impossível fazer o teste estatístico pois há poucos casos.

Não foi observada diferença estatística na produção de proteinase (índice PR_Z) pelos isolados de *Candida* sp. entre as amostras coletadas antes do início do experimento (t_0) e após 8 semanas de ingestão dos queijos (t_f) pelos participantes da pesquisa ($p > 0,05$) (Figura 5.9).

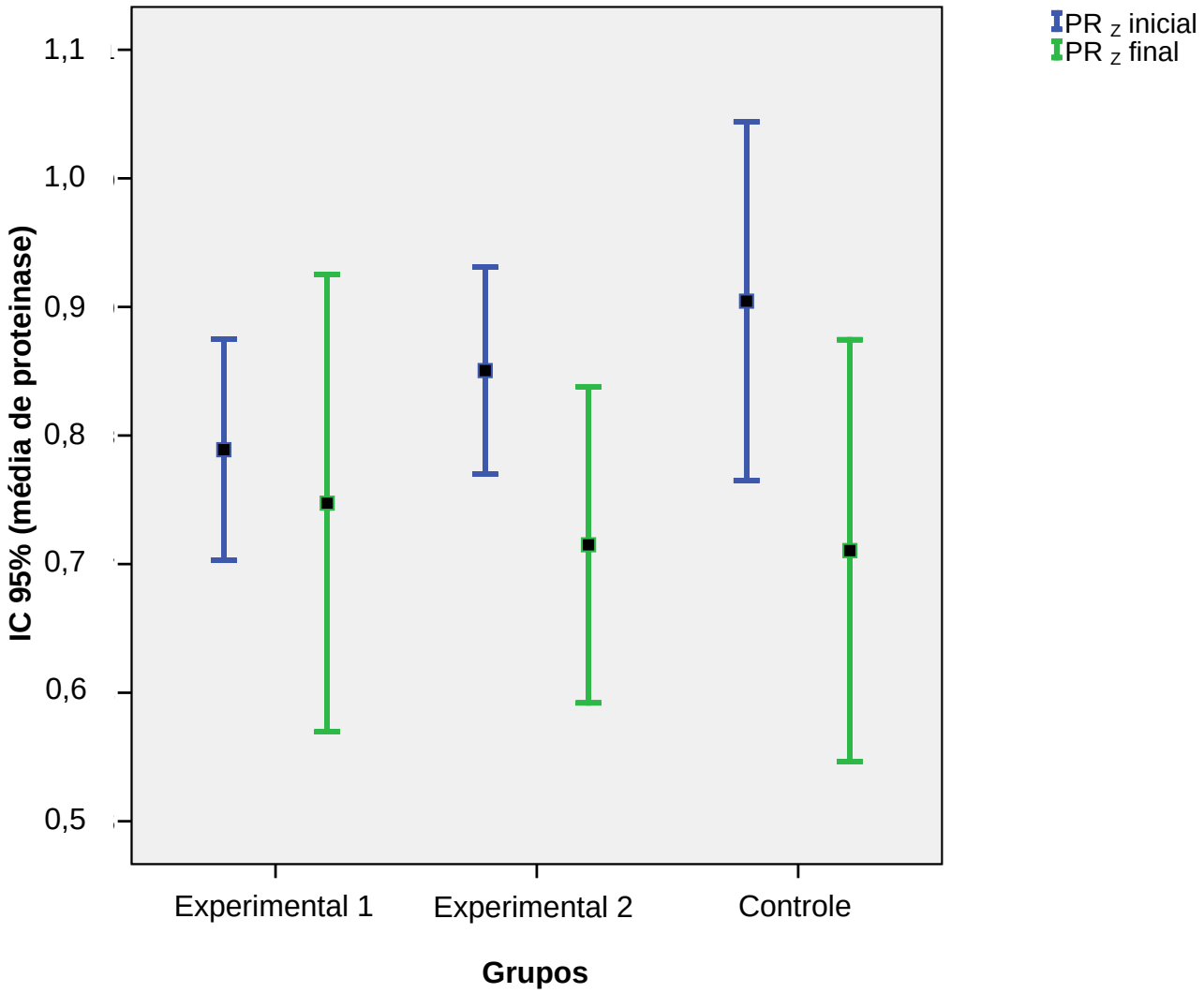

Figura 5.9 - Redução dos índices PR $_Z$ de proteinase produzidos pelos isolados de *Candida* spp nos três grupos do experimento após ingestão diária dos queijos por 8 semanas (t_f)

6 DISCUSSÃO

6.1 DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE UFCS DE *CANDIDA* A PARTIR DAS AMOSTRAS BUCAIS

Neste estudo, os três grupos da pesquisa apresentavam características demográficas e clínicas semelhantes (p> 0,05) (Tabelas 5.1 e 5.2). As variáveis (idade; idade da prótese superior e inferior; etnia; sexo; problemas de saúde; hipertensão; diabetes; colesterol; problemas cardíacos, lesão na mucosa e tipo de prótese) observadas não interferiram na redução de *Candida* dos grupos experimentais (*p*> 0,125).

Antes do início do experimento, todos os pacientes assintomáticos apresentaram níveis de contaminação iguais ou menores que 3 log UFC/ml de *Candida*. Alguns autores consideram alta colonização ou prevalência, contagens de *Candida* acima de 50 UFCs e abaixo de 4 log UFC, entretanto, essa alta prevalência não está associada necessariamente à presença de doença pois assim como neste estudo, Abbeele et al. (45) observou que a média de quantidade de *Candida* encontrada em amostras coletadas através de esfregaço com *swab* na região do palato de pacientes sem estomatite sob prótese ou candidose bucal foi de 77 e 948 UFCs. Ao final do experimento, observou-se a redução total de *Candida* sp. em 5 pacientes da pesquisa, 2 pessoas em cada um dos grupos experimental 1 e 2, e 3 pessoas do grupo controle, esse resultado não apresentou diferença estatística (*p*= 0,866) (Tabela 5.10).

Torna-se dificíl mais comparações a respeito da quantidade de *Candida* na cavidade bucal observada neste estudo com outras pesquisas devido às diferenças entre as populações estudadas e a técnica de coleta das amostras bucais. Todavia, em estudo de Meurman et al. (176) avaliando a prevalência de espécies de *Candida* em idosos residentes em casa de repouso, coletou amostras através de enxaguado bucal e observou média de 3,66 log de UFC/ ml de *Candida* sp. em todos os idosos, entretanto, esse valor refe-se aos pacientes sem fazer distinção de presença ou ausência de estomatite sob prótese. Em estudo de Loster et al. (42) os autores fizeram uma análise

micológica em usuários de próteses dentárias entre os anos de 2007 a 2011, classificando como crescimento intermediário (20 a 50 UFCs de *Candida*), intenso (50 a 100 UFCs de *Candida*), e abundante (valores acima de 2 log UFC de *Candida*), e observaram um crescimento (intermediário a abundante) significativamente maior no ano de 2011 quando comparado com os outros anos. Assim os autores citados anteriormente, não fizeram distinção entre pacientes com e sem estomatite sob prótese.

6.2 REDUÇÃO DE *CANDIDA* APÓS O CONSUMO DO QUEIJO MINAS FRESCAL SUPLEMENTADO COM PROBIÓTICOS

A alta prevalência de *Candida* em usuários de próteses apresenta um risco potencial de manifestarem a estomatite sob prótese ou candidose bucal, o que torna-se interessante o desenvolvimento de métodos preventivos que reduzam os níveis de colonização desse micro-organismo da cavidade bucal, principalmente, associando-se à utilização de métodos alternativos que não causem efeitos adversos nesses pacientes.

Neste estudo, os micro-organismos probióticos *L. acidophilus* NCFM e *L. rhamnosus* Lr-32 foram suplementados em queijo minas frescal com o objetivo de se observar a redução da prevalência de *Candida* bucal em usuários de próteses totais que não apresentavam sintomatologia de candidose ou estomatite sob prótese. Foi observado que a ingestão diária de 20 g de queijo suplementada com probióticos por 8 semanas foi capaz de reduzir a quantidade de *Candida* isolada de amostras bucais em níveis significativos, quando comparada àquela em que o grupo ingeriu o queijo sem suplementação probiótica ($p < 0,05$) (Figura 5.7).

Sabe-se que os possíveis benefícios que os probióticos proporcionam são cepa-específicas, isto é, os efeitos benéficos de uma bactéria estão associados à cada cepa probiótica avaliada (177). Desta forma, os resultados deste trabalho tornam-se mais interessantes, pois permitiu conhecer quais cepas probióticas foram capazes de reduzir o micro-organismo *Candida*. Hatakka et al. (118) utilizaram queijo Emmental contendo uma mistura de

cepas probióticas (*Lactococcus lactis; L. helveticus*; *L. rhamnosus* GG; *L. rhamnosus* LC705, e *Propionibacterium freudereichii* ssp *sermanii* JS) e observaram que a intervenção com probióticos reduziu o risco de alta contagem de *Candida* em torno de 75%, e os autores concluíram que os probióticos podem ser eficientes no controle de *Candida* bucal em idosos, porém, não se sabe qual deles foi eficiente nessa redução. Assim como em estudo conduzido por Ishikawa (156) que utilizou um bioproduto contendo uma mistura de cepas probióticas, no caso, *L. rhamnosus* HS111 e *L. acidophilus* HS101.

Apesar de ter sido observada a redução nos grupos experimentais quando comparada com o grupo controle, o mesmo não ocorre quando comparado a quantidade de redução de *Candida* sp. entre os grupos experimentais ($p > 0,05$). Matsubara et al. (154) realizaram um estudo com camundongos DBA/2 imunossuprimidos e infectados oralmente por *C. albicans*, e o estudo demonstrou que os probióticos (*L. acidophilus* NCFM e *L. rhamnosus* Lr-32) foram capazes de reduzir significantemente a colonização de *C. albicans* na mucosa oral, sendo que o tratamento com *L. rhamnosus* Lr-32 mostrou ser mais eficaz que o tratamento com a nistatina. Assim como em estudo *in vitro* realizado por Ishikawa (156) que utilizando os probióticos *L. acidophilus* NCFM; *L. rhamnosus* Lr-32, *L. acidophilus* HS101 e *L. rhamnosus* HN001 (Howaru) para inibir o crescimento de *Candida* observou que a cepa *L. rhamnosus* Lr-32 apresentou maior probabilidade de inibir completamente o micro-organismo *Candida* quando comparada às outras cepas testadas.

6.3 PREVALÊNCIA DE *CANDIDA* SP. EM USUÁRIOS DE PRÓTESES TOTAIS

Diferentes espécies de *Candida* são encontradas na microbiota de indivíduos saudáveis sem causar candidose bucal. Muitos fatores podem levar a um aumento no número desses micro-organismos, facilitando a sua colonização e permitindo tornar-se patogênico.

Das 135 pessoas triadas, 51,1% apresentaram resultado positivo para a presença de *Candida* sp. Resultado semelhante foi encontrado por Gümrü et al. (178) que avaliaram a distribuição de diferentes espécies de *Candida* em pacientes com e sem sinais e sintomas de estomatite sob prótese, verificando que 52% dos indivíduos sem estomatite sob prótese apresentaram resultado positivo para a presença de *Candida* sp.

Dos 59 sujeitos da pesquisa, tanto antes do início do experimento quanto após o seu término, observou-se que a espécie mais prevalente foi de *C. albicans* com 65,1% e 64,8%, respectivamente. Resultado semelhante foi encontrado em estudo de Lyon et al. (41) que avaliaram a presença de *Candida* sp. em 90 usuários de próteses totais saudáveis, e encontraram uma prevalência de 64,4% de *C. albicans* em seus isolados.

No total, a prevalência de espécies de *Candida* não-albicans isoladas antes do início do experimento correspondeu a 34,9% dos isolados de *Candida* sp., sendo que as espécies isoladas foram *C. glabrata* (15,9%); *C. dubliniensis* (6,3%); *C. tropicalis* (4,8%). Já após as 8 semanas do experimento, o total de *Candida* não-*albicans* correspondeu a 35,2%, sendo as espécies isoladas: *C. glabrata* (16,7%), *C. tropicalis* (13,0%) e *C. dubliniensis* (3,7%), resultados estes, semelhantes aos de Cavaleiro et al. (179) que observaram que a espécie mais frequente isolada de usuários de próteses totais saudáveis foi de *C. albicans* (66,0%), seguida de *C. glabrata* (9,0%) e *C. tropicalis* (4,5%). Loster et al. (42), objetivando fazer uma análise micológica da cavidade bucal de usuários de próteses parciais, observou que dos pacientes que apresentavam resultados positivo para a presença de *Candida*, não distinguindo de pacientes com e sem estomatite sob prótese, a frequência de *C. glabrata* isolada de amostras do palato foi a segunda maior (10.8%) seguida de *C. tropicalis* (2.3%). Em estudo de Zomorodian et al. (53) os pacientes com estomatite sob prótese também apresentaram maior prevalência de *C. glabrata* dentre as espécies *Candida* não-*albicans.* A ocorrência de uma maior observação de *C. glabrata* em isolados de amostras da cavidade bucal de pacientes, com e sem estomatite sob prótese, sugere a necessidade de maiores investigações a respeito da patogenicidade desta espécie.

A ocorrência de mais de uma espécie de *Candida* isolada de amostras bucais têm sido evidenciado em pacientes usuários de próteses com estomatite

sob prótese (50, 53, 179, 180). No presente estudo, a presença de mais de uma espécie de *Candida* nas amostras bucais também pôde ser observada, pois o isolamento primário das mesmas foram feitas em meio CHROMagar *Candida*® que permitiu diferenciar presuntivamente espécies *C. albicans* ou *dubliniensis* de *Candida* não-*albicans*. Diferentes espécies de *Candida* apresentam morfologia e coloração diferentes entre si, lembrando que para a identificação final são necessários outros testes. Antes do início do experimento, no total, 6,8% das pessoas apresentaram colonização mista por duas espécies de *Candida*, sendo que foi observado 1 (5,3%) pessoa do grupo experimental 1, 1 (5,0%) pessoa do grupo experimental 2, e 2 (10,0%) pessoas do grupo controle. Já nas amostras coletadas após 8 semanas do experimento observou-se que, no total, 3,4% das pessoas apresentaram colonização mista por duas espécies de *Candida*, sendo observado uma pessoa (5,3%) do grupo experimental 1, e uma pessoa (5,0 %) do grupo controle.

A cavidade bucal pode ser colonizada transitoriamente por outros gêneros de leveduras devido à exposição do indivíduo a diferentes fontes, como por exemplo, alimentos e bebidas. Neste estudo, após 8 semanas do experimento, foi possível isolar *S. cerevisiae* de 1 (5,6%) pessoa do grupo experimental 1, resultado semelhante observado em estudo de Abeele et al. (45); Zomorodian et al. (53), Loster et al. (42), e Cavaleiro et al. (179).

6.4 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS POR *CANDIDA*

O desenvolvimento de infecções é favorecido por uma combinação de fatores ligados ao hospedeiro e ao micro-organismo, e não somente por um fator de virulência isolado (181). Por este motivo, observa-se que em pacientes usuários de próteses sem candidose bucal ou estomatite sob-prótese, seus isolados de *Candida* sp. apresentam produção de fosfolipase (96-98) e proteinase (77, 96). Neste trabalho, as análise iniciais e finais não apresentaram diferença com relação à quantidade de fosfolipase e proteinase produzidas pelos isolados de *Candida* sp. das amostras bucais de acordo com os grupos (Figuras 5.8 e 5.9, respectivamente).

Pelo menos em um isolado de cada uma das espécies de *Candida,* foi possível observar a produção de fosfolipase (Tabelas 5.6 e 5.13) e proteinase (Tabela 5.8 e 5.15). Estes resultados estão de acordo com estudos que também puderam observar a produção de fosfolipase por espécies *Candida* não-*albicans* (90, 182-185). Entretanto, alguns autores observam a produção de fosfolipase somente por *C. albicans* (98, 178, 186). Essa diferença encontrada na literatura pode ser atribuída à variação da cepa de *Candida* avaliada e à formulação do meio de cultura utilizado para o teste (90). A divergência de resultados encontrados na literatura não ocorre com relação à produção de proteinase por espécies de *C. albicans* e *Candida* não-*albicans* (97, 98, 182-184, 186).

Além disso, na literatura é possível observar a avaliação da quantidade de enzima (fosfolipase e proteinase) produzida, relacionando-a com a espécie de *Candida* isolada, principalmente *C. albicans* (96-98, 178, 187). Entretanto, não foi possível fazer essa observação neste trabalho, pois as avaliações são observadas de acordo com os grupos da pesquisa, isto é, grupo experimental 1 e 2, e grupo controle (Tabela 5.13 e 5.15). Desta forma, devido ao número de isolados de cada uma das espécies de *Candida* em cada um dos grupos ser pequeno, este tipo de análise não foi possível de ser realizada.

7 CONCLUSÕES

- Os probióticos *L. acidophilus* NCFM e *L. rhamnosus* Lr-32 suplementados em queijo minas frescal foram capazes de reduzir a prevalência de *Candida* bucal, em pacientes usuários de próteses totais, após ingestão diária dos queijos por 8 semanas consecutivas, quando comparadas ao grupo controle.

- Antes do início da pesquisa, a espécie de *Candida* mais prevalente foi *C. albicans*, seguida de *C. glabrata*; *C. dubliniensis*; *C. tropicalis*, *C. krusei, C. famata*, e *C. kefyr*. Após 8 semanas do experimento, a espécie de *Candida* mais prevalente continuou sendo a de *C. albicans*, seguida de *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. dubliniensis*.

- De acordo com o queijo ingerido, os grupos experimentais não apresentaram diferença estatisticamente significante na redução de UFC de *Candida* quando comparadas entre si.

- Quantitativamente, não houve diferença significativa na produção das exoenzimas, fosfolipase e proteinase, nos tempos inicial (t_0) e após 8 semanas de ingestão do queijo (t_f), assim como entre as diferentes espécies de *Candida.*

REFERÊNCIAS[1]

1 Reichl RB. Oral candidiasis: an old disease of growing concern. Gen Dent. 1990 Mar-Apr;38(2):114-20.

2 Ghannoum MA, Jurevic RJ, Mukherjee PK, Cui F, Sikaroodi M, Naqvi A, et al. Characterization of the Oral Fungal Microbiome (Mycobiome) in Healthy Individuals. Plos Pathogens. 2010 Jan;6(1):e1000713.

3 Samaranayake LP, Leung WK, Jin LJ. Oral mucosal fungal infections. Periodontology 2000. 2009;49(Feb):39-59.

4 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.

5 Farah CS, Ashman RB, Challacombe SJ. Oral candidosis. Clin Dermatol. 2000 Sep-Oct;18(5):553-62.

6 Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of Candida albicans. Trends Microbiol. 2001 Jul;9(7):327-35.

7 Jarvis WR. Epidemiology of Nosocomial Fungal-Infections, with Emphasis on Candida Species. Clin Infect Dis. 1995 Jun;20(6):1526-30.

8 Fridkin SK, Jarvis WR. Epidemiology of nosocomial fungal infections. Clin Microbiol Rev. 1996 Oct;9(4):499-511.

9 Sidrim JRM. Micologia médica à luz de autores contemporâneos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.

10 Shay K, Truhlar MR, Renner RP. Oropharyngeal candidosis in the older patient. J Am Geriatr Soc. 1997 Jul;45(7):863-70.

11 Marcos-Arias C, Vicente JL, Sahand IH, Eguia A, De-Juan A, Madariaga L, et al. Isolation of Candida dubliniensis in denture stomatitis. Arch Oral Biol. 2009 Feb;54(2):127-31.

12 Ramage G, Tomsett K, Wickes BL, Lopez-Ribot JL, Redding SW. Denture stomatitis: a role for Candida biofilms. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2004 Jul;98(1):53-9.

13 Samaranayake LP. Denture stomatitis. Aust Dent J. 1992 Aug;37(4):319-20.

14 Eggimann P, Garbino J, Pittet D. Epidemiology of Candida species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. Lancet Infect Dis. 2003 Nov;3(11):685-702.

1 De acordo com Estilo Vancouver

15 Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. Postgrad Med J. 2002 Aug;78(922):455-9.

16 Chavasco JK, Paula CR, Hirata MH, Aleva NA, Melo CE, Gambale W, et al. Molecular identification of Candida dubliniensis isolated from oral lesions of HIV-positive and HIV-negative patients in Sao Paulo, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2006 Jan-Feb;48(1):21-6.

17 Sullivan D, Coleman D. Candida dubliniensis: characteristics and identification. J Clin Microbiol. 1998 Feb;36(2):329-34.

18 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 Oct;23(5):377-83.

19 Li L, Redding S, Dongari-Bagtzoglou A. Candida glabrata, an emerging oral opportunistic pathogen. J Dent Res. 2007 Mar;86(3):204-15.

20 Watamoto T, Samaranayake LP, Jayatilake JAMS, Egusa H, Yatani H, Seneviratne CJ. Effect of filamentation and mode of growth on antifungal susceptibility of Candida albicans. Int J Antimicrob Agents. 2009 Oct;34(4):333-9.

21 Phan QT, Belanger PH, Filler SG. Role of hyphal formation in interactions of Candida albicans with endothelial cells. Infect Immun. 2000 Jun;68(6):3485-90.

22 Lu Q, Jayatilake JAMS, Samaranayake LP, Jin LJ. Hyphal invasion of Candida albicans inhibits the expression of human beta-defensins in experimental oral candidiasis. Journal of Investigative Dermatology. 2006 Sep;126(9):2049-56.

23 Ramage G, Mowat E, Jones B, Williams C, Lopez-Ribot J. Our Current Understanding of Fungal Biofilms. Crit Rev Microbiol. 2009;35(4):340-55.

24 Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. Candida albicans secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. Microbiol Mol Biol Rev. 2003 Sep;67(3):400-28.

25 Urizar JMA. Candidiasis orales. Rev Iber Micol. 2002;19:17-21.

26 Quindos G. Las micosis en el amanecer de Siglo XXI. Rev Iber Micol. 2002;19:1-4.

27 Gardiner GE, Heinemann C, Baroja ML, Bruce AW, Beuerman D, Madrenas J, et al. Oral administration of the probiotic combination Lactobacillus rhamnosus GR-1 and L-fermentum RC-14 for human intestinal applications. Int Dairy J. 2002;12(2-3):191-6.

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

29 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 Dec;19(6):347-51.

30 FAO/WHO. Working group report of drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada; April 30 and May 1, 2002.

31 Cardarelli HR, Buriti FCA, Castro IA, Saad SMI. Inulin and oligofructose improve sensory quality and increase the probiotic viable count in potentially synbiotic petit-suisse cheese. Lwt-Food Sci Technol. 2008;41(6):1037-46.

32 Saarela M, Virkajarvi I, Alakomi HL, Sigvart-Mattila P, Matto J. Stability and functionality of freeze-dried probiotic Bifidobacterium cells during storage in juice and milk. Int Dairy J. 2006 Dec;16(12):1477-82.

33 Homayouni A, Azizi A, Ehsani MR, Yarmand MS, Razavi SH. Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. Food Chem. 2008 Nov 1;111(1):50-5.

34 Cardarelli HR, Aragon-Alegro LC, Alegro JHA, de Castro IA, Saad SMI. Effect of inulin and Lactobacillus paracasei on sensory and instrumental texture properties of functional chocolate mousse. J Sci Food Agr. 2008 Jun;88(8):1318-24.

35 Cruz AG, Antunes AEC, Sousa ALOP, Faria JAF, Saad SMI. Ice-cream as a probiotic food carrier. Food Res Int. 2009 Nov;42(9):1233-9.

36 Payne S, Gibson G, Wynne A, Hudspith B, Brostoff J, Tuohy K. In vitro studies on colonization resistance of the human gut microbiota to Candida albicans and the effects of tetracycline and Lactobacillus plantarum LPK. Curr Issues Intest Microbiol. 2003 Mar;4(1):1-8.

37 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 Jul;141(1):29-36.

38 Strus M, Kucharska A, Kukla G, Brzychczy-Wloch M, Maresz K, Heczko PB. The in vitro activity of vaginal Lactobacillus with probiotic properties against Candida. Infect Dis Obstet Gynecol. 2005 Jun;13(2):69-75.

39 Strom K, Sjogren J, Broberg A, Schnurer J. Lactobacillus plantarum MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid. Appl Environ Microbiol. 2002 Sep;68(9):4322-7.

40 Tsang CSP, Samaranayake LP. Oral yeasts and coliforms in HIV-infected individuals in Hong Kong. Mycoses. 2000;43(7-8):303-8.

41 Lyon JP, da Costa SC, Totti VMG, Munhoz MFV, de Resende MA. Predisposing conditions for Candida spp. carriage in the oral cavity of denture wearers and individuals with natural teeth. Can J Microbiol. 2006 May;52(5):462-7.

42 Loster BW, Loster J, Wieczorek A, Ryniewicz A. Mycological Analysis of the Oral Cavity of Patients Using Acrylic Removable Dentures. Gastroent Res Pract. 2012;2012:951572.

43 Malani AN. Is age a risk factor for *Candida glabrata* colonisation? Mycoses-Diagnosis, therapy and prophlaxis of fungal diseases. 2011 Nov;54(6):531-7.

44 Yang YL, Leaw SN, Wang AH, Chen HT, Cheng WT, Lo HJ. Characterization of yeasts colonizing in healthy individuals. Med Mycol. 2011 Jan;49(1):103-6.

45 Abbeele AV, de Meel H, Ahariz M, Perraudin JP, Beyer I, Courtois P. Denture contamination by yeasts in the elderly. Gerodontology. 2008 Dec;25(4):222-8.

46 Dongari-Bagtzoglou A, Fidel PL, Jr. The host cytokine responses and protective immunity in oropharyngeal candidiasis. J Dent Res. 2005 Nov;84(11):966-77.

47 Ramage G, Tomsett K, Wickes BL, Lopez-Ribot JL, Redding SW. Denture stomatitis: A role for Candida biofilms. Oral Surg Oral Med O. 2004 Jul;98(1):53-9.

48 Rautemaa R, Rusanen P, Richardson M, Meurman JH. Optimal sampling site for mucosal candidosis in oral cancer patients is the labial sulcus. J Med Microbiol. 2006 Oct;55(10):1447-51.

49 Rusanen P, Siikala E, Uittamo J, Richardson M, Rautemaa R. A novel method for sampling the microbiota from the oral mucosa. Clin Oral Invest. 2009 Jun;13(2):243-6.

50 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 Oct;23(5):377-83.

51 Samaranayake LP, MacFarlane TW, Lamey PJ, Ferguson MM. A comparison of oral rinse and imprint sampling techniques for the detection of yeast, coliform and Staphylococcus aureus carriage in the oral cavity. J Oral Pathol. 1986 Aug;15(7):386-8.

52 Ribeiro DG, Pavarina AC, Dovigo LN, Machado AL, Giampaolo ET, Vergani CE. Prevalence of Candida spp. associated with bacteria species on complete dentures. Gerodontology. 2011 Sep;29(3):203-8.

53 Zomorodian K, Haghighi NN, Rajaee 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 Feb;49(2):208-11.

54 Lewis MAO, Samaranyake LP, Lamey PJ. Diagnosis and Treatment of Oral Candidosis. J Oral Maxil Surg. 1991 Sep;49(9):996-1002.

55 Soysa NS, Samaranayake LP, Ellepola ANB. Antimicrobials as a contributory factor in oral candidosis - a brief overview. Oral Diseases. 2008 Mar;14(2):138-43.

56 Sweet SP. Selection and pathogenicity of Candida albicans in HIV infection. Oral Dis. 1997 May;3 Suppl 1:S88-95.

57 Abbas AK, Lichtman AH. Imunologia básica: Funções e distúrbios do sistema imunológico. 3a ed. Rio de Janeiro: Elservier; 2009.

58 Aw D, Silva AB, Palmer DB. Immunosenescence: emerging challenges for an ageing population. Immunology. 2007 Apr;120(4):435-46.

59 Hakim FT, Gress RE. Immunosenescence: deficits in adaptive immunity in the elderly. Tissue Antigens. 2007 Sep;70(3):179-89.

60 Saad SMI. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. Braz J Pharmaceutical Sci. 2006;42(1):1-15.

61 Zaremba ML, Daniluk T, Rozkiewicz D, Cylwik-Rokicka D, Kierklo A, Tokajuk G, et al. Incidence rate of Candida species in the oral cavity of middle-aged and elderly subjects. Adv Med Sci. 2006;51 Suppl 1:233-6.

62 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 Apr;78(4):857-68.

63 Mandali G, Sener ID, Turker SB, Ulgen H. Factors affecting the distribution and prevalence of oral mucosal lesions in complete denture wearers. Gerodontology. 2011 Jun;28(2):97-103.

64 Budtz- Jorgensen E. Histopathology, immunology, and serology of oral yeast infections. Diagnosis of oral candidosis. Acta Odontol Scand. 1990;48:37-43.
65 Ikebe K, Morii K, Matsuda K, Hata K, Nokubi T. Association of candidal activity with denture use and salivary flow in symptom-free adults over 60 years. J Oral Rehabil. 2006 Jan;33(1):36-42.

66 Reichart PA. Oral mucosal lesions in a representative cross-sectional study of aging Germans. Community Dent Oral Epidemiol. 2000 Oct;28(5):390-8.

67 Shulman JD, Rivera-Hidalgo F, Beach MM. Risk factors associated with denture stomatitis in the United States. J Oral Pathol Med. 2005 Jul;34(6):340-6.

68 Hahnel S, Rosentritt M, Handel G, Burgers R. In vitro evaluation of artificial ageing on surface properties and early Candida albicans adhesion to prosthetic resins. J Mat Science-Mat Med. 2009 Jan;20(1):249-55.

69 Koch C, Burgers R, Hahnel S. Candida albicans adherence and proliferation on the surface of denture base materials. Gerodontology. 2013 Dec;30(4):309-13.

70 Sanchez-Vargas LO, Estrada-Barraza D, Pozos-Guillen AJ, Rivas-Caceres R. Biofilm formation by oral clinical isolates of Candida species. Arch Oral Biol. 2013 Oct;58(10):1318-26.

71 Thein ZM, Samaranayake YH, Samarayanake LP. Characteristics of dual species Candida biofilms on denture acrylic surfaces. Arch Oral Biol. 2007 Dec;52(12):1200-8.

72 Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. In vitro biofilm formation of Candida albicans and non-albicans Candida species under dynamic and anaerobic conditions. Arch Oral Biol. 2007 Aug;52(8):761-7.

73 Mutluay MM, Oguz S, Orstavik D, Floystrand F, Dogan A, Soderling E, et al. Experiments on in vivo biofilm formation and in vitro adhesion of Candida species on polysiloxane liners. Gerodontology. 2010 Dec;27(4):283-91.

74 Emami E, de Grandmont P, Rompre PH, Barbeau J, Pan S, Feine JS. Favoring trauma as an etiological factor in denture stomatitis. J Dent Res. 2008 May;87(5):440-4.

75 Pereira CA, Toledo BC, Santos CT, Pereira Costa AC, Back-Brito GN, Kaminagakura E, et al. Opportunistic microorganisms in individuals with lesions of denture stomatitis. Diag Microbiol Infect Dis. 2013 Aug;76(4):419-24.

76 Baena-Monroy T, Moreno-Maldonado V, Franco-Martinez F, Aldape-Barrios B, Quindos G, Sanchez-Vargas LO. Candida albicans, Staphylococcus aureus and Streptococcus mutans colonization in patients wearing dental prosthesis. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2005;10 Suppl 1:E27-39.

77 Ramage G, Zalewska A, Cameron DA, Sherry L, Murray C, Finnegan MB, et al. A comparative in vitro study of two denture cleaning techniques as an effective strategy for inhibiting Candida albicans biofilms on denture surfaces and reducing inflammation. J Prosthodont. 2012 Oct;21(7):516-22.

78 Sadig W. The denture hygiene, denture stomatitis and role of dental hygienist. Int J Dent Hyg. 2010 Aug;8(3):227-31.

79 Wilson J. The aetiology, diagnosis and management of denture stomatitis. Br Dent J. 1998 Oct 24;185(8):380-4.

80 Oksala E. Factors predisposing to oral yeast infections. Acta Odontol Scand. 1990 Feb;48(1):71-4.

81 Lamey PJ, Darwazeh AM, Frier BM. Oral disorders associated with diabetes mellitus. Diabet Med. 1992 Jun;9(5):410-6.

82 Darwazeh AM, Lamey PJ, Samaranayake LP, MacFarlane TW, Fisher BM, Macrury SM, et al. The relationship between colonisation, secretor status and in-vitro adhesion of Candida albicans to buccal epithelial cells from diabetics. J Med Microbiol. 1990 Sep;33(1):43-9.

83 Khosravi AR, Yarahmadi S, Baiat M, Shokri H, Pourkabireh M. Factors affecting the prevalence of yeasts in the oral cavity of patients with diabetes mellitus. J Mycol Medi. 2008 Jun;18(2):83-8.

84 Manfredi M, McCullough MJ, Al-Karaawi ZM, Hurel SJ, Porter SR. The isolation, identification and molecular analysis of Candida spp. isolated from the oral cavities of patients with diabetes mellitus. Oral Microbiol Immunol. 2002 Jun;17(3):181-5.

85 Hancocks S. Summary of: Knowledge of removable partial denture wearers on denture hygiene. Brit Dent J. 2013 Nov;215(10):516-7.

86 Paillaud E, Merlier I, Dupeyron C, Scherman E, Poupon J, Bories PN. Oral candidiasis and nutritional deficiencies in elderly hospitalised patients. Brit J Nutr. 2004 Nov;92(5):861-7.

87 Kulak-Ozkan Y, Kazazoglu E, Arikan A. Oral hygiene habits, denture cleanliness, presence of yeasts and stomatitis in elderly people. J Oral Rehabil. 2002 Mar;29(3):300-4.

88 Glass RT, Conrad RS, Bullard JW, Goodson LB, Mehta N, Lech SJ, et al. Evaluation of Microbial Flora Found in Previously Worn Prostheses from the Northeast and Southwest Regions of the United States. J Prosthet Dent. 2010 Jun;103(6):384-9.

89 Darwazeh AMG, Hammad MM, Al-Jamaei AA. The relationship between oral hygiene and oral colonization with Candida species in healthy adult subjects. Int J Dent Hygi. 2010 May;8(2):128-33.

90 Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. Clinical Microbiology Reviews. 2000 Jan;13(1):122-143.

91 Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of Candida albicans. Trends Microbiol. 2001 Jul;9(7):327-35.

92 Tsang CSP, Chu FCS, Leung WK, Jin LJ, Samaranayake LP, Siu SC. Phospholipase, proteinase and haemolytic activities of Candida albicans isolated from oral cavities of patients with type 2 diabetes mellitus. J Med Microbiol. 2007 Oct;56(10):1393-8.

93 Schaller M, Borelli C, Korting HC, Hube B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of Candida albicans. Mycoses. 2005 Nov;48(6):365-77.

94 Leidich SD, Ibrahim AS, Fu Y, Koul A, Jessup C, Vitullo J, et al. Cloning and disruption of caPLB1, a phospholipase B gene involved in the pathogenicity of Candida albicans. Journal of Biological Chemistry. 1998 Oct 2;273(40):26078-86.

95 Samaranayake YH, Dassanayake RS, Cheung BPK, Jayatilake JAMS, Yeung KWS, Yau JYY, et al. Differential phospholipase gene expression by Candida albicans in artificial media and cultured human oral epithelium. Apmis. 2006 Dec;114(12):857-66.

96 Koga-Ito CY, Lyon JP, Vidotto V, de Resende MA. Virulence factors and antifungal susceptibility of Candida albicans isolates from oral candidosis patients and control individuals. Mycopathologia. 2006 Apr;161(4):219-23.

97 Marcos-Arias C, Eraso E, Madariaga L, Aguirre JM, Quindos G. Phospholipase and proteinase activities of Candida isolates from denture wearers. Mycoses. 2011 Jul;54(4):E10-E6.

98 Pinto E, Ribeiro IC, Ferreira NJ, Fortes CE, Fonseca PA, Figueiral MH. Correlation between enzyme production, germ tube formation and susceptibility to fluconazole in Candida species isolated from patients with denture-related stomatitis and control individuals. J Oral Pathol Med. 2008 Nov;37(10):587-92.

99 Ibrahim AS, Mirbod F, Filler SG, Banno Y, Cole GT, Kitajima Y, et al. Evidence Implicating Phospholipase as a Virulence Factor of Candida-Albicans. Infect Immun. 1995 May;63(5):1993-8.

100 Kadir T, Pisiriciler R, Akyuz S, Yarat A, Emekli N, Ipbuker A. Mycological and cytological examination of oral candidal carriage in diabetic patients and non-diabetic control subjects: thorough analysis of local aetiologic and systemic factors. J Oral Rehabili. 2002 May;29(5):452-7.

101 Wu T, Samaranayake LP. The expression of secreted aspartyl proteinases of Candida species in human whole saliva. J Med Microbiol. 1999 Aug;48(8):711-20.

102 Ramage G, VandeWalle K, Lopez-Ribot JL, Wickes BL. The filamentation pathway controlled by the Efg1 regulator protein is required for normal biofilm formation and development in Candida albicans. Fems Microbiol Lett. 2002 Aug 27;214(1):95-100.

103 Rajendran R, Robertson DP, Hodge PJ, Lappin DF, Ramage G. Hydrolytic Enzyme Production is Associated with Candida Albicans Biofilm Formation from Patients with Type 1 Diabetes. Mycopathologia. 2010 Oct;170(4):229-35.

104 Ramage G, Coco B, Sherry L, Bagg J, Lappin DF. In Vitro Candida albicans Biofilm Induced Proteinase Activity and SAP8 Expression Correlates with In Vivo Denture Stomatitis Severity. Mycopathologia. 2012 Jul;174(1):11-9.

105 Naidu AS, Bidlack WR, Clemens RA. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). Crit Rev Food Sci Nutr. 1999 Jan;39(1):13-126.

106 De Martinis EC, Franco BD. Inhibition of Listeria monocytogenes in a pork product by a Lactobacillus sake strain. Int J Food Microbiol. 1998 Jun 30;42(1-2):119-26.

107 Sookkhee S, Chulasiri M, Prachyabrued W. Lactic acid bacteria from healthy oral cavity of Thai volunteers: inhibition of oral pathogens. J Appl Microbiol. 2001 Feb;90(2):172-9.

108 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 Apr;100(4):754-64.

109 Isolauri E, Majamaa H, Arvola T, Rantala I, Virtanen E, Arvilommi H. Lactobacillus casei strain GG reverses increased intestinal permeability induced by cow milk in suckling rats. Gastroenterology. 1993 Dec;105(6):1643-50.

110 Shroff KE, Meslin K, Cebra JJ. Commensal enteric bacteria engender a self-limiting humoral mucosal immune response while permanently colonizing the gut. Infect Immun. 1995 Oct;63(10):3904-13.

111 Perdigon G, de Macias ME, Alvarez S, Oliver G, de Ruiz Holgado AP. Systemic augmentation of the immune response in mice by feeding fermented milks with Lactobacillus casei and Lactobacillus acidophilus. Immunology. 1988 Jan;63(1):17-23.

112 Villena J, Salva S, Aguero G, Alvarez S. Immunomodulatory and protective effect of probiotic Lactobacillus casei against Candida albicans infection in malnourished mice. Microbiol Immunol. 2011 Jun;55(6):434-45.

113 Sutas Y, Soppi E, Korhonen H, Syvaoja EL, Saxelin M, Rokka T, et al. Suppression of lymphocyte proliferation in vitro by bovine caseins hydrolyzed with Lactobacillus casei GG-derived enzymes. J Allergy Clin Immunol. 1996 Jul;98(1):216-24.

114 Plantinga TS, van Bergenhenegouwen J, Jacobs C, Joosten LA, van't Land B, Garssen J, et al. Modulation of Toll-like receptor ligands and Candida albicans-induced cytokine responses by specific probiotics. Cytokine. 2012 Jul;59(1):159-65.

115 Çaglar E, Kavaloglu SC, Kuscu OO, Sandalli N, Holgerson PL, Twetman S. Effect of chewing gums containing xylitol or probiotic bacteria on salivary mutans streptococci and lactobacilli. Clin Oral Investig. 2007 Dec;11(4):425-9.

116 Twetman S, Derawi B, Keller M, Ekstrand K, Yucel-Lindberg T, Stecksen-Blicks C. Short-term effect of chewing gums containing probiotic Lactobacillus reuteri on the levels of inflammatory mediators in gingival crevicular fluid. Acta Odontol Scand. 2009 Feb;67(1):19-24.

117 Ahola AJ, Yli-Knuuttila H, Suomalainen T, Poussa T, Ahlstrom A, Meurman JH, et al. Short-term consumption of probiotic-containing cheese and its effect on dental caries risk factors. Arch Oral Biol. 2002 Nov;47(11):799-804.

118 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 Feb;86(2):125-30.

119 Ibrahim F, Ruvio S, Granlund L, Salminen S, Viitanen M, Ouwehand AC. Probiotics and immunosenescence: cheese as a carrier. FEMS Immunol Med Microbiol. 2010 Jun 1;59(1):53-9.

120 Gill HS, Rutherfurd KJ, Cross ML, Gopal PK. Enhancement of immunity in the elderly by dietary supplementation with the probiotic Bifidobacterium lactis HN019. Am J Clin Nutr. 2001 Dec;74(6):833-9.

121 Stecksen-Blicks C, Sjostrom I, Twetman S. Effect of long-term consumption of milk supplemented with probiotic lactobacilli and fluoride on dental caries and general health in preschool children: a cluster-randomized study. Caries Res. 2009;43(5):374-81.

122 Gill HS, Rutherfurd KJ, Cross ML. Dietary probiotic supplementation enhances natural killer cell activity in the elderly: an investigation of age-related immunological changes. J Clin Immunol. 2001 Jul;21(4):264-71.

123 Shimauchi H, Mayanagi G, Nakaya S, Minamibuchi M, Ito Y, Yamaki K, et al. Improvement of periodontal condition by probiotics with Lactobacillus salivarius WB21: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. J Clin Periodontol. 2008 Oct;35(10):897-905.

124 Mayanagi G, Kimura M, Nakaya S, Hirata H, Sakamoto M, Benno Y, et al. Probiotic effects of orally administered Lactobacillus salivarius WB21-containing tablets on periodontopathic bacteria: a double-blinded, placebo-controlled, randomized clinical trial. J Clin Periodontol. 2009 Jun;36(6):506-13.

125 Çaglar E, Cildir SK, Ergeneli S, Sandalli N, Twetman S. Salivary mutans streptococci and lactobacilli levels after ingestion of the probiotic bacterium Lactobacillus reuteri ATCC 55730 by straws or tablets. Acta Odontol Scand. 2006 Oct;64(5):314-8.

126 Çaglar E, Kuscu OO, Cildir SK, Kuvvetli SS, Sandalli N. A probiotic lozenge administered medical device and its effect on salivary mutans streptococci and lactobacilli. Int J Paediatr Dent. 2008 Jan;18(1):35-9.

127 ANVISA ANdVS-. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. 2008 [updated 2008 julho/2008; cited 2012 04/julho]; Available from: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm.

128 Lee YK, Nomoto K, Salminen S, Gorbach SL. Handbook of probiotics. New York: Wiley; 1999.

129 Saarela M, Mogensen G, Fonden R, Matto J, Mattila-Sandholm T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. J Biotechnol. 2000 Dec 28;84(3):197-215.

130 Collins JK, Thornton G, Sullivan GO. Selection of probiotics strains for human applications. Int Dairy J. 1998;8(5):487-90.

131 Stanton C, Fitzgerald G, Ross RP, Desmond C, Coakley M, Collins JK. Challenges facing development of probiotic functional foods. In: Farnworth ER, editor. Handbook of fermented functional foods. Boca Rator: CRC; 2003.

132 FAO/WHO J. Expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic-acid bacteria. Rowe: FAO/WHO; 2001.

133 Sanders ME. Probiotics: Considerations for human health. Nutri Rev. 2003 Mar;61(3):91-9.

134 Sarkar S. Potential of probiotics as pharmaceutical agent: a review. Brit Food J. 2013;115(11):1658-87.

135 Reid G, Bruce AW. Probiotics to prevent urinary tract infections: the rationale and evidence. World J Urol. 2006 Feb;24(1):28-32.

136 Anukam KC, Osazuwa E, Osemene GI, Ehigiagbe F, Bruce AW, Reid G. Clinical study comparing probiotic Lactobacillus GR-1 and RC-14 with metronidazole vaginal gel to treat symptomatic bacterial vaginosis. Microbes Infect. 2006b Oct;8(12-13):2772-6.

137 Marcone V, Calzolari E, Bertini M. Effectiveness of vaginal administration of Lactobacillus rhamnosus following conventional metronidazole therapy: how to lower the rate of bacterial vaginosis recurrences. New Microbiol. 2008 Jul;31(3):429-33.

138 Hilton E, Rindos P, Isenberg HD. Lactobacillus GG vaginal suppositories and vaginitis. J Clin Microbiol. 1995 May;33(5):1433.

139 Anokhina IV, Kravtsov EG, Protsenko AV, Yashina NV, Yermolaev AV, Chesnokova VL, et al. Bactericidal activity of culture fluid components of Lactobacillus fermentum strain 90 TS-4 (21) clone 3, and their capacity to modulate adhesion of Candida albicans yeast-like fungi to vaginal epithelial cells. Bull Exp Biol Med. 2007 Mar;143(3):359-62.

140 Rossi A, Rossi T, Bertini M, Caccia G. The use of Lactobacillus rhamnosus in the therapy of bacterial vaginosis. Evaluation of clinical efficacy in a population of 40 women treated for 24 months. Arch Gynecol Obstet. 2010 Jun;281(6):1065-9.

141 Kitajima H, Sumida Y, Tanaka R, Yuki N, Takayama H, Fujimura M. Early administration of Bifidobacterium breve to preterm infants: randomised controlled trial. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 1997 Mar;76(2):F101-7.

142 Lin HC, Su BH, Chen AC, Lin TW, Tsai CH, Yeh TF, et al. Oral probiotics reduce the incidence and severity of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. Pediatrics. 2005 Jan;115(1):1-4.

143 Manzoni P, Mostert M, Leonessa ML, Priolo C, Farina D, Monetti C, et al. Oral supplementation with Lactobacillus casei subspecies rhamnosus prevents enteric colonization by Candida species in preterm neonates: a randomized study. Clin Infect Dis. 2006 Jun 15;42(12):1735-42.

144 Lin HC, Hsu CH, Chen HL, Chung MY, Hsu JF, Lien RI, et al. Oral probiotics prevent necrotizing enterocolitis in very low birth weight preterm infants: a multicenter, randomized, controlled trial. Pediatrics. 2008 Oct;122(4):693-700.

145 Gill HS, Cross ML, Rutherfurd KJ, Gopal PK. Dietary probiotic supplementation to enhance cellular immunity in the elderly. Br J Biomed Sci. 2001;58(2):94-6.

146 Gill HS, Rutherfurd KJ. Probiotic supplementation to enhance natural immunity in the elderly: effects of a newly characterized immunostimulatory strain Lactobacillus rhamnosus HN001 (DR20 (TM)) on leucocyte phagocytosis. Nutr Res. 2001 Jan-Feb;21(1-2):183-9.

147 Marteau P, Cuillerier E, Meance S, Gerhardt MF, Myara A, Bouvier M, et al. Bifidobacterium animalis strain DN-173 010 shortens the colonic transit time in healthy women: a double-blind, randomized, controlled study. Alimentary Pharmacol Ther. 2002 Mar;16(3):587-93.

148 Bu LN, Chang MH, Ni YH, Chen HL, Cheng CC. Lactobacillus casei rhamnosus Lcr35 in children with chronic constipation. Pediatr Int. 2007 Aug;49(4):485-90.

149 Kruis W, Schutz E, Fric P, Fixa B, Judmaier G, Stolte M. Double-blind comparison of an oral Escherichia coli preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis. Alimentary Pharmacology & Ther. 1997 Oct;11(5):853-8.

150 Rembacken BJ, Snelling AM, Hawkey PM, Chalmers DM, Axon ATR. Non-pathogenic Escherichia coli versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. Lancet. 1999 Aug 21;354(9179):635-9.

151 Kruis W, Fric P, Pokrotnieks J, Lukas M, Fixa B, Kascak M, et al. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic Escherichia coli Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. Gut. 2004 Nov;53(11):1617-23.

152 Krasse P, Carlsson B, Dahl C, Paulsson A, Nilsson A, Sinkiewicz G. Decreased gum bleeding and reduced gingivitis by the probiotic Lactobacillus reuteri. Swed Dent J. 2006;30(2):55-60.

153 Wagner RD, Warner T, Pierson C, Roberts L, Farmer J, Dohnalek M, et al. Biotherapeutic effects of Bifidobacterium spp. on orogastric and systemic candidiasis in immunodeficient mice. Rev Iberoam Micol. 1998 Dec;15(4):265-70.

154 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 Apr;18(3):260-4.

155 Hasslöf P, Hedberg M, Twetman S, Stecksen-Blicks C. Growth inhibition of oral mutans streptococci and candida by commercial probiotic lactobacilli--an in vitro study. BMC Oral Health. 2010 Jul;10:18.

156 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.

157 Souza CHB, Saad SMI. Viability of Lactobacillus acidophilus La-5 added solely or in co-culture with a yoghurt starter culture and implications on physico-chemical and related properties of Minas fresh cheese during storage. Lwt-Food Sci Technol. 2009 Mar;42(2):633-40.

158 Buriti FA, Rocha JS, Saad SMI. Incorporation of Lactobacillus acidophilus in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. Int Dairy J. 2005;15:1279-88.

159 Buriti FCA, Okazaki TY, Alegro JH, Saad SMI. Effect of a probiotic mixed culture on texture profile and sensory performance of Minas fresh cheese in comparison with the traditional products. Arch Latinoam Nutr. 2007 Jun;57(2):179-85.

160 Buriti FCA, Okasaki TY, Alegro HA, Saad SMI. Effect of a probiotic mixed culture on texture profile and sensory performance of Minas fresh cheese in comparison with the traditional products. Arch Latinoam Nutr. 2007;57(2):179-85.

161 Buriti FCA, Rocha JS, Assis EG, Saad SMI. Probiotic potencial of Minas fresh cheese prepared with tha addition of Lactobacillus paracasei. LWT-Food Sci Tecnol. 2005 Mar;38(2):173-80.

162 Souza CHB, Buriti FCA, Behrens JH, Saad SMI Sensory evaluation of probiotic Minas fresh cheese with Lactobacillus acidophilus added solely or in co-culture with a thermophilic starter culture. International J Food Technol. 2008 May;43(5):871-7.

163 Brasil. Ministério da agricultura. Secretaria da Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Regulamento técnico de identidade e qualidade de queijos Stat. Portaria nº 146, de 7 de março de 1996. Diário Oficial da União, 11 mar. 1996.

164 Silverman JMJ, Epstein L, Samaranayake LP. Laboratory diagnosis of oral candidosis. In: Samaranayake LP, MacFarlane TW. Oral Candidosis. London: Wright- Butterworth; 1990. p. 213-37.

165 Davenport JC. The oral distribution of *Candida* in denture stomatites. Br Dent J. 1990;129:151.

166 Oliver DE, Shillitoe EJ. Effects of Smoking on the Prevalence and Intraoral Distribution of Candida-Albicans. J Oral Pathol Med. 1984;13(3):265-70.

167 Pinjon E, Sullivan D, Salkin I, Shanley D, Coleman D. Simple, inexpensive, reliable method for differentiation of Candida dubliniensis from Candida albicans. J Clin Microbiol. 1998 Jul;36(7):2093-5.

168 Coleman DC, Sullivan DJ, Bennett DE, Moran GP, Barry HJ, Shanley DB. Candidiasis: The emergence of a novel species, Candida dubliniensis. Aids. 1997 Apr;11(5):557-67.

169 Alves SH, Milan EP, Sant'Ana PD, Oliveira LO, Santurio JM, Colombo AL. Hypertonic sabouraud broth as a simple and powerful test for Candida dubliniensis screening. Diagn Microbiol Infect Dis. 2002 May;43(1):85-6.

170 Taschdjian CL, Burchall JJ, Kozinn PJ. Rapid identification of Candida albicans by filamentation on serum and serum substitutes. AMA J Dis Child. 1960 Feb;99:212-5.

171 Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennett DE, Coleman DC. Candida Dubliniensis Sp-Nov - Phenotypic and Molecular Characterization of a Novel Species Associated with Oral Candidosis in Hiv-Infected Individuals. Microbiology-Uk. 1995 Jul;141:1507-21.

172 Buesching WJ, Kurek K, Roberts GD. Evaluation of the Modified Api 20c System for Identification of Clinically Important Yeasts. J Clin Microbiol. 1979;9(5):565-9.

173 Sandven P. Laboratory Identification and Sensitivity Testing of Yeast Isolates. Acta Odontol Scand. 1990 Feb;48(1):27-36.

174 Price MF, Wilkinson ID, Gentry LO. Plate Method for Detection of Phospholipase-Activity in Candida-Albicans. Sabouraudia. 1982 Mar;20(1):7-14.

175 Staib F. Serum-proteins as nitrogen source for yeastlike fungi. Sabouraudia. 1965 Oct;4(3):187-93.

176 Meurman JH, Parnanen P, Seneviratne CJ, Samaranayake LP, Saarinen AM, Kari K. Prevalence and antifungal drug sensitivity of non-albicans Candida in oral rinse samples of self-caring elderly. Gerodontology. 2010 Dec;28(4):246-52.

177. Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. Lancet. 2003 Feb 8;361(9356):512-9.

178 Gumru B, Kadir T, Uygun-Can B, Ozbayrak S. Distribution and phospholipase activity of Candida species in different denture stomatitis types. Mycopathologia. 2006 Dec;162(6):389-94.

179 Cavaleiro I, Proenca L, Felix S, Salema-Oom M. Prevalence of yeast other than Candida albicans in denture wearers. J Prosthodont. 2012 Jul;22(5):351-7.

180 Abaci O, Haliki-Uztan A, Ozturk B, Toksavul S, Ulusoy M, Boyacioglu H. Determining Candida spp. incidence in denture wearers. Mycopathologia. 2010 May;169(5):365-72.

181 Odds FC. Pathogenesis of Candida Infections. J Am Acad Dermatol. 1994 Sep;31(3):S2-S5.

182 Kantarcioglu AS, Yucel A. Phospholipase and protease activities in clinical Candida isolates with reference to the sources of strains. Mycoses. 2002 Jun;45(5-6):160-5.

183 Furlaneto-Maia L, Specian AF, Bizerra FC, de Oliveira MT, Furlaneto MC. In vitro evaluation of putative virulence attributes of oral isolates of Candida spp. Obtained from elderly healthy individuals. Mycopathologia. 2008 Oct;166(4):209-17.

184 Hannula J, Saarela M, Dogan B, Paatsama J, Koukila-Kahkola P, Pirinen S, et al. Comparison of virulence factors of oral Candida dubliniensis and Candida albicans isolates in healthy people and patients with chronic candidosis. Oral Microbiol Immunol. 2000 Aug;15(4):238-44.

185 Anil S, Samaranayake LP. Brief exposure to antimycotics reduces the extracellular phospholipase activity of Candida albicans and Candida tropicalis. Chemotherapy. 2003;49(5):243-7.

186 da Costa KRC, Ferreira JC, Komesu MC, Candido RC. Candida albicans and Candida tropicalis in Oral Candidosis: Quantitative Analysis, Exoenzyme Activity, and Antifungal Drug Sensitivity. Mycopathologia. 2009 Feb;167(2):73-9.

187 Thiele MCD, Carvalho ADE, Gursky LC, Rosa RT, Samaranayake LP, Rosa EAR. The role of candidal histolytic enzymes on denture-induced stomatitis in patients living in retirement homes. Gerodontology. 2008 Dec;25(4):229-36.

ANEXO A- Parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

FOUSP 110 anos

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER DE APROVAÇÃO
FR 331277
Protocolo 55/10

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa **APROVOU** o protocolo de pesquisa **"Utilização de probióticos adicionados em queijo minas frescal para controle da prevalência de candidíase oral – estudo duplo-cego randomizado",** de responsabilidade da Pesquisadora Tatiana Yuriko Miyazima,sob orientação do(a) Prof. Dr. Atlas Edson Moleros Nakamae.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 29 de junho de 2011.

Profa. Dra. Marcia Turolla Wanderley
Coordenadora do CEP-FOUSP

Av. Prof. Lineu Prestes, 2227 - Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira".
São Paulo - SP - CEP 05508-900 –Tel. (0XX11) 3091-7960

ANEXO B- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título do estudo: "***Utilização de probióticos adicionados em queijo minas frescal para controle da prevalência de Candida spp.– estudo duplo-cego randomizado"***
Pesquisador (es) responsável (is): Tatiana Yuriko Miyazima, Atlas Edson Moleros Nakamae
Instituição/Departamento: Faculdade de Odontologia da USP/ Departamento de Prótese
Telefone para contato: (11) 3091-7888
Local da coleta de dados:_____

Prezado(a) Senhor(a):

- Você está sendo convidado (a) a responder às perguntas deste questionário de forma totalmente **voluntária**.
- Antes de concordar em participar desta pesquisa e responder este questionário, é muito importante que você entenda as informações e instruções deste documento.
- Os pesquisadores deverão responder todas as suas dúvidas antes que você decida participar.
- Você tem o direito de **desistir** de participar da pesquisa a qualquer momento, sem nenhum prejuízo no tratamento de prótese total.
- Você ficará com uma **cópia** deste termo.

Objetivo do estudo: Em alguns pacientes que usam próteses totais, é comum encontrar na boca um tipo de fungo conhecido como *Candida*. Existem bactérias boas para o organismo, chamadas de probióticos, que nos defendem contra microrganismos causadores de doenças. Portanto, o objetivo deste trabalho é avaliar se o consumo de queijo com probióticos, por pacientes que usam próteses totais e que apresentam *Candida* na boca, consegue controlar e eliminar esse fungo.
Procedimentos: Primeiro, será realizado um questionário, que deverá ser respondido ao pesquisador; em seguida, o(a) Sr(a) deverá bochechar uma solução de água destilada estéril (10 ml) por 60 segundos; caso seja comprovada a presença do fungo na boca. O(A) Sr(a) receberá uma porção do queijo minas frescal, sendo consumido diariamente durante 56 dias. Por último, novas coletas serão feitas na 4ª e 8ª semana, da mesma maneira que a primeira coleta, após consumido o queijo.
Benefícios: Esta pesquisa trará maior conhecimento sobre a eficácia dos probióticos no controle da *Candida*, trazendo benefícios para sua saúde. Além disso, é conhecido que os probióticos

Av. Prof. Lineu Prestes, 2227 - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo SP
Tel.: (11) 3091.7840 Fax: (11) 3091.7842

fortalecem o sistema imunológico, regulam o intestino, controlam a diarréia, e previnem alguns tipos de doenças.

Riscos: O queijo não deverá ser consumido por pessoas alérgicas ou com intolerância a lactose, pois o queijo é feito de leite, e também por pessoas com a saúde debilitada. A sua participação nesta pesquisa não representará quaisquer outros riscos, seja de ordem física ou psicológica. Se por um acaso, o produto causar qualquer desconforto, você deverá suspender o consumo do produto e comunicar imediatamente os pesquisadores.

Gastos: Tanto o queijo, como os procedimentos serão feitos sem nenhum custo para você.

Assistência: É garantido assistência, caso ocorra algum problema causado pela pesquisa.

Sigilo: As informações fornecidas por você serão confidenciais e de conhecimento apenas dos pesquisadores responsáveis. Você não será identificado em nenhum momento, mesmo quando os resultados desta pesquisa forem divulgados sob qualquer forma.

Depósito/Armazenamento das amostras orais: As culturas das amostras das leveduras serão armazenadas em uma micoteca pertencente ao Departamento de Prótese da Faculdade de Odontologia da USP.

Eu_____,

manifesto a:

☐ necessidade de novo consentimento a cada pesquisa.

☐ dispensa de novo consentimento a cada pesquisa.

Assinatura:_____

_____
Pesquisadora: Tatiana Yuriko Miyazima

Data:_____/_____/ 201___.

ANEXO C- Preparação do ágar MRS modificado para *Lactobacillus acidophilus* NCFM

COMPOSIÇÃO

Triptona ……...……... 10,0 g

Extrato de levedura …….…… 5,0 g

Tween 80 …….……... 1,0 g

Dipotássio hidrogenofosfato …….….. 2,6 g

Sódio acetato trihidrato …….. 5,0 g

Di-amônio hidrogeno citrato …….. 2,0 g

Magnésio sulfato heptahidrato …… 0,2 g

Manganês (II) sulfato monohidrato …… 0,05 g

Ágar bacteriológico ……..…….. 13,0 g

PREPARO

Suspender os ingredientes em 1000 mL de água destilada. Ferver o meio até

dissolução total. Distribuir em frascos e esterilizar em autoclave a 121$_o$C por 15 minutos. Esfriar a 47$_o$C+1$_o$C e adicionar 100 mL de solução de maltose a 20% estéril.

ANEXO D- Ficha clínica

ANEXO 1

FICHA DO PACIENTE

CÓDIGO:_____

NOME:_____

CASA DE REPOUSO:_____TEL:_____

Gênero: ( )F ( )M

Data de nascimento:____/____/____ Idade:_____anos

Etnia: ( )leucoderma ( )melanoderma ( )outro_____

Alimentação: ( )sopa ( )sopa batida ( )arroz, feijão ( )carne
( )verdura ( )legumes ( )frutas ( )frutas batidas

Há quanto tempo mora na casa de repouso? _____anos

Tem algum problema de saúde? ( )não ( )sim
( )hipertensão ( )diabetes ( )colesterol ( )triglicérides ( )doença cardíaca ( )intolerância a lactose ( )outros

Medicamentos:_____
_____
_____
_____.

Lesão na mucosa: ( )leucoplasia ( )hiperplasia ( )ulceração ( )lesão pigmentada

Tem ardência bucal? ( )não ( )sim

Tem sensação de boca seca? ( )não ( )sim

Qual prótese usa? (superior/inferior ou superior) ( )bimaxilar ( )unimaxilar

O sr(a) lembra há quanto tempo utiliza a prótese? ( )não ( )sim
Idade da prótese: superior: _____anos
inferior: _____anos

COLETA DA AMOSTRA PARA AVALIAÇÃO LABORATORIAL

____/____/____- INÍCIO Condição higiene da PT (com placa) ( )não ( )sim

____/____/____- 4 SEMANAS Condição higiene da PT (com placa) ( )não ( )sim

____/____/____- 8 SEMANAS Condição higiene da PT (com placa) ( )não ( )sim

ANEXO E- Ágar Fubá (*Corn-meal*) com Tween 80

COMPOSIÇÃO

Corn-meal agar	quantidade especificada pelo fabricante
Tween 80	12 ml
Água destlidade	1000 ml

PREPARO

Preparar o meio ágar conforme especificado pelo fabricante e acrescentar Tween 80. Homogeneizar. Autoclavar por 15 minutos a 121°C. Distribuir nas lamínulas estéreis.

ANEXO F- Meio para Fermentação de Carboidratos

COMPOSIÇÃO

Extrato de levedura	2,7 g
Peptona	4,5 g
Água destilada	600 ml

PREPARO

Dissolver o estrato de levedura e a peptona em água destilada. Distribuir 4 ml do meio em tubos de ensaio contendo tubo Durhan na posição invertida. Autoclavar por 15 minutos a 121°C. Deixar resfriar e acrescentar a cada tubo, 1,5 ml de solução de açúcar. Homogeneizar.