



Fundação Educacional do Município de Assis
Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis
Campus "José Santilli Sobrinho"

AMANDA PATRÍCIA PEREIRA MITROVINI

**ESTUDO *IN VITRO* DA EFICÁCIA DE PROBIÓTICOS NO
TRATAMENTO DA CANDIDA VULVOVAGINAL**

Assis

2013

AMANDA PATRÍCIA PEREIRA MITROVINI

**ESTUDO *IN VITRO* DA EFICÁCIA DE PROBIÓTICOS NO
TRATAMENTO DA CANDIDA VULVOVAGINAL**

Trabalho de conclusão de curso de
graduação apresentado ao Instituto
Municipal de Ensino Superior de Assis,
como requisitos do Curso de
Graduação.

Orientadora: Ms. Gilcelene Bruzon
Área de Concentração: Química

Assis – SP

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

MITROVINI, Amanda Patrícia Pereira.

Estudo *In Vitro* Da Eficácia De Probióticos No Tratamento Da Candida Vulvovaginal.
Fundação Educacional do Município de Assis – FEMA – Assis, 2013.

46p.

Orientadora: Gilcelene Bruzon

Trabalho de Conclusão de Curso – Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis –
IMESA.

1. Candidíase Vulvovaginal. 2. Probióticos

CDD: 660

Biblioteca da FEMA

ESTUDO *IN VITRO* DA EFICÁCIA DE PROBIÓTICOS NO TRATAMENTO DA CANDIDA VULVOVAGINAL

AMANDA PATRÍCIA PEREIRA MITROVINI

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis, como requisitos do Curso de Graduação, analisado pela seguinte comissão examinadora:

Orientadora: Ms. Gilcelene Bruzon
Analisador: Ms. Patrícia Cavani Martins De Mello

Assis – SP

2013

DEDICATÓRIA

A Deus e a Virgem Maria por tudo que me proporciona na vida. À minha mãe e meu pai, os quais amo muito, pelo exemplo de vida e família. A meu irmão por tudo que me ajudou até hoje.

AGRADECIMENTOS

À DEUS e a Virgem Maria, primeiramente, por ter me dado força durante esses quatro anos de curso, a meio de dificuldades. Por ter me iluminado nas decisões mais difíceis e por ter me guiado ao longo do curso para trilhar o caminho mais correto possível.

A vocês, queridos pais, que são responsáveis por este momento tão marcante em minha vida. Por sua dedicação, pelo amor que me fez mais forte, fazendo entender que sou capaz de ir mais além. A vocês que desde o começo acreditaram, incentivando - me sempre a busca de novos conhecimentos, me dando conselhos, contribuindo para o meu crescimento na vida acadêmica. Esta vitória também é de vocês.

A professora Gilcelene Bruzon que me acolheu de braços abertos me conduzindo pelos caminhos da pesquisa com paciência e muita dedicação, contribuindo para que meu sonho se tornasse realidade.

A professora Patrícia Cavani Martins de Mello pela dedicação e todo empenho para realização deste trabalho.

Ao departamento de microbiologia do hospital universitário de Londrina, por ter cedido à amostra de *Candida Albicans* para realização dos experimentos deste trabalho.

Agradeço a todas as minhas amigas que estiveram juntas comigo compartilhando a convivência, as alegrias, as frustrações, as descobertas, enfim pelo o que aprendemos.

A minha família, pelo apoio, dedicação e incentivo nos momentos de dificuldade, e por ficarem ao meu lado para a realização desse sonho.

Obrigada a todos!

“É justamente a possibilidade de realizar um sonho que torna a vida interessante.”

(Paulo Coelho)

RESUMO

Candidíase vulvovaginal é uma infecção da vulva e da vagina causada por fungos *Candida sp*, que se habitam na mucosa vaginal e digestiva, podendo tornar-se patogênica sob determinadas condições que alteram o ambiente vaginal. Os probióticos são microrganismos vivos que exibem um efeito benéfico na saúde do indivíduo quando ingeridos em quantidade adequada, podendo inibir o crescimento de microrganismos patogênicos. Uma microbiota vaginal normal é rica em *Lactobacillus* onde se produz uma barreira defensiva, dificultando a proliferação da *Candida*. O presente trabalho objetivou avaliar a eficácia da utilização de *Lactobacillus* no tratamento de *Candida* vulvovaginal. Para a realização deste estudo foi utilizado o teste *in vitro* para eliminar as dúvidas em relação à ação antifúngica dos probióticos, além de correlacionar com o teste de sensibilidade se os probióticos eram eficazes na inibição da *Candida* tanto quanto a sensibilidade da levedura ao sabonete íntimo, fluconazol e miconazol. As análises foram realizadas através do método de sensibilidade disco-difusão com dois tipos de ágar diferentes em duplicata sendo utilizados os mesmos procedimentos para os dois meios. A partir dos resultados podemos verificar que a espécie da levedura *Candida* é inibida pelos probióticos Yakult® e o iogurte natural, assim podemos verificar que o consumo destes produtos pode inibir o crescimento de outros microrganismos, sendo que o sabonete íntimo, miconazol, e fluconazol também apresentaram halo de inibição indicando assim que estes produtos também ajudam a combater a *Candida*.

Palavras Chave: Candidíase Vulvovaginal, Probióticos, *Candida*.

ABSTRACT

Vulvovaginal candidiasis is an infection of the vulva and vagina caused by fungi *Candida sp*, which inhabit the digestive and vaginal mucosa may become pathogenic under certain conditions that alter the environment vaginal. Os probiotics are live microorganisms that exhibit a beneficial effect on individual's health when ingested in adequate amounts, may inhibit the growth of pathogenic microorganisms. A normal vaginal flora is rich in *Lactobacillus* which produces a defensive barrier hampering the proliferation of *Candida*. This study aimed to evaluate the efficacy of *Lactobacillus* in the treatment of vulvovaginal *Candida*. For this study the test was used in vitro to eliminate doubts regarding the antifungal activity of the probiotic action, and to correlate with the sensitivity test whether probiotics were effective in inhibiting *Candida* as well as the sensitivity of yeast to intimate wash, fluconazole and miconazole. The analyzes were performed by the method disk diffusion susceptibility with two different types of agar in duplicate with the same procedures used for the two media. The results can be seen that the species *Candida* yeast is inhibited by Yakult ® and probiotic yoghurt , so we can see that the consumption of these products can inhibit the growth of other microorganisms , and the intimate soap, miconazole , fluconazole , and also showed inhibition zone thus indicating that these products also help fight *Candida* .

Key words: Vulvovaginal Candidiasis, Probiotics, *Candida*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Candidíase com edema de pequenos lábios e microerosões. Corrimento grumoso branco aderido à parede vaginal.....	20
Figura 2 - Exemplos de bactérias probióticas.....	24
Figura 3- Mecanismo de ação do probiótico: <i>Lactobacillus casei</i>	27
Figura 4 - Benefícios do consumo de probióticos a saúde humana.....	28
Figura 5 - Consequências da redução dos <i>Lactobacillus</i>	29
Figura 6 – Teste de sensibilidade pelo método disco-difusão.....	31
Figura 7- Amostra Yakult® em meio PCA e BHI.....	39
Figura 8 - Amostra Iogurte Natural meio PCA e BHI.....	39
Figura 9 - Amostra Sabonete em meio PCA e BHI.....	40
Figura 10 - Amostra Miconazol em meio PCA e BHI.....	40
Figura 11 - Amostra Fluconazol em meio PCA e BHI.....	41

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. CANDIDA.....	15
3. CANDIDÍASE VULVOVAGINAL	17
3.1 DEFINIÇÃO.....	17
3.2 FATORES DE RISCO E RECORRÊNCIA	18
3.3 DIAGNÓSTICO CLÍNICO E LABORATORIAL	19
3.4 PREVENÇÃO E TRATAMENTO.....	20
3.4.1 PREVENÇÃO	20
3.4.2 TRATAMENTOS	21
4. PROBIÓTICOS	23
4.1 DEFINIÇÃO.....	23
4.2 AÇÃO	24
4.3 ESPÉCIES	26
4.3.1 LACTOBACILLUS ACIDOPHILLUS.....	26
4.3.2 LACTOBACILLUS CASEI	26
4.4 BENEFÍCIOS.....	28
4.5 UTILIZAÇÕES DOS PROBIÓTICOS	29
4.5.1 INFECÇÕES UROGENITAIS.....	29
5. VERIFICAÇÃO DA COMPETIÇÃO ENTRE MICRORGANISMOS ..	30
5.1 MÉTODO DE DISCO DIFUSÃO	30
6. APLICAÇÃO NO ENSINO MÉDIO.....	32
7. MATERIAIS E MÉTODOS	34
7.1 MATERIAIS	34
7.2 REAGENTES	34
7.3 MÉTODO.....	35
7.3.1 Aquisição e reativação da candida	35
7.3.2 Preparo dos meios de cultura.....	35
7.3.3 Inoculação do microrganismo	35
7.3.4 Teste de inibição de crescimento da candida.....	36
7.3.4.1 Teste com yakult®	36
7.3.4.2 Teste com iogurte natural	36

7.3.4.3 Teste com nitrato de miconazol	36
7.3.4.4 Teste com fluconazol	36
7.3.4.5 Teste com sabonete íntimo	37
7.3.5 Incubação e verificação dos resultados	37
8. RESULTADO E DISCUSSÃO	38
9. CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS.....	43

1. INTRODUÇÃO

A candidíase é extremamente comum, uma vez que quase todas as mulheres experimentam esse desagradável quadro genital pelo menos uma vez em algum momento de suas vidas.

A candidíase vulvovaginal é uma infecção causada pelos fungos *candida sp*, que são leveduras ovais que habitam a mucosa vaginal e digestiva, e crescem quando o meio se torna favorável para seu desenvolvimento (NOLETO, 2006).

A *candida albicans* é a mais frequente entre a *candida glabrata*, *candida tropicalis*, *candida parapsilosis* e outras. A *candida albicans* faz parte do nosso organismo, se proliferam por um distúrbio, ou seja, aproveitam de debilidade ou imunodeficiência para se multiplicar e disseminar além dos níveis normais (SILVA et al., 2006).

A micose vulvovaginal foi descrita pela primeira vez por J. S. Wilkinson, em 1949, ao estabelecer a existência de fungos na vagina com a aparição de vaginites, sendo seus sintomas intensa coceira, odor, prurido, corrimento, ardor ao urinar, eritemas, e desconforto vaginal (BARBEDO; SGARBI, 2010).

Não é uma doença de transmissão exclusivamente sexual, pode ser causada por vários fatores, como o uso de pílulas anticoncepcionais, de drogas contra úlceras, a insuficiência de secreção digestiva, o excesso de açúcar, entre outros. O uso de determinados antibióticos pode diminuir ou mesmo acabar com a flora de lactobacilos que protege a vagina dos microrganismos nocivos ocasionando a proliferação da candidíase (HOLANDA et al., 2007).

Para o tratamento da *candida* deve-se manter um controle, matar os fungos que se espalham pelo corpo e fortalecer o sistema imunológico, por isso, o mais indicado no tratamento é o uso dos antifúngicos, podendo ser utilizado por via oral como o fluconazol 150 mg, ou cetoconazol 200 mg, e no tratamento local com nistatina ou miconazol creme (FERRACIN; OLIVEIRA, 2005).

Os probióticos são definidos como suplementos alimentares à base de microrganismos vivos, que se administrados em quantidades suficientes são benéficos a nossa saúde e ao bem estar (BADARÓ et al., 2008).

As bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* são as mais utilizadas como suplementos probióticos para alimentos, sendo mais comum em produtos lácteos como leites fermentados, iogurtes, sorvetes e queijos. (SAAD, 2006).

A microbiota vaginal normal é rica em *lactobacillus* onde se forma o ácido láctico, que propicia acidez adequada do ambiente vaginal, um pH em torno de 4,5, que se produz uma barreira defensiva, dificultando a proliferação da *candida*. Os *lactobacillus* competem com os fungos, bloqueiam o receptor epitélio vaginal, e são capazes de produzir substâncias bactericidas que inibam a germinação (ÁLVARES; SVIDZINSKI; CONSOLARO, 2007).

O objetivo deste trabalho é verificar a eficiência de probiótico na inibição do crescimento de *Candida Albicans*, utilizando-se o método de disco difusão.

2. CANDIDA

Espécies de *candida* são classificadas como fungos do tipo levedura que fazem parte da microbiota normal dos indivíduos saudáveis.

Uma vez que esta levedura faz parte da microbiota humana, ela é considerada uma micose oportunista, podendo, no entanto, desencadear várias doenças em indivíduos normais.

Segundo a taxonomia essa espécie localiza-se no reino *Fungi*, *Filo Ascomycota*, *Classe Saccharomycetes*, *Ordem Saccharomycetales*, *Família Saccharomycetaceae* (BARBEDO; SGARBI, 2010).

O gênero *candida* é constituído por 200 espécies diferentes de leveduras, causadoras de micoses superficiais ou invasivas em seres humanos, que normalmente vivem no nosso corpo, como orofaringe, cavidade bucal, dobras da pele, secreções brônquicas, vagina, urina e fezes (ÁLVARES; SVIDZINSKI; CONSOLARO, 2007).

Várias espécies de *candida* fazem parte da microbiota normal como *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, *Candida glabrata*, *Candida kefyr*, dentre outras (MENDES et al., 2005).

Sendo que a que tem maior frequência nos tratos geniturinária, gastrointestinal, e a cavidade bucal é a *Cândida albicans* que é o agente mais comum das vaginites micóticas, ocorrendo em 80 a 95 % dos casos (ROSA ; RUMEL ,2004).

Suas colônias têm coloração branca a creme, um aspecto que varia desde cremosas e lisas a rugosas e sulcadas. Algumas espécies apresentam micélio e reproduzem-se por brotamento blastoconídio, possuindo um pseudomicélio bem desenvolvido (MENDES et al., 2005).

Há alguns anos vêm se observando que a prevalência de vulvovaginite por *Candida sp* causada por espécies não *albicans* como *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei* , a incidência destas espécies vem se aumentando e a razão para isso é o uso inadequado de antimicóticos (ROSA ; RUMEL ,2004). Isso se torna um

fato preocupante, pois *Candida glabrata* e a *Candida krusei* são mais resistentes aos antifúngicos clássicos utilizados na prática clínica (CORRÊA et al., 2009)

A capacidade dessas leveduras para se reproduzir são superfícies quentes e úmidas, mudança de pH, causando frequentemente vaginite, dermatite das fraldas e candidíase oral (SILVA et al., 2006).

3. CANDIDÍASE VULVOVAGINAL

3.1 DEFINIÇÃO

A candidíase é muito comum, pois quase todas as mulheres já tiveram esse desagradável quadro genital pelo menos uma vez em algum momento de suas vidas.

Wilkinson em 1949 foi quem descreveu pela primeira vez uma relação entre a existência de fungos na vagina e o aparecimento de vaginite, assim os conhecimentos foram se evoluindo (ÁLVARES; SVIDZINSKI; CONSOLARO, 2007).

Candidíase vulvovaginal é uma infecção da vulva e vagina, causada pelo crescimento anormal de fungos do tipo leveduras, espécies de *Candida sp*, que são encontrados nas mucosas vaginal e digestiva, que pode se tornar patogênicas, sob determinadas condições que alteram o ambiente vaginal (HOLANDA et al., 2007).

A infecção por *candida albicans* é devido ao alto teor de glicogênio do meio vaginal, sendo que o excesso de glicogênio é uma excelente fonte de carbono, para o crescimento das leveduras (ÁLVARES; SVIDZINSKI; CONSOLARO, 2007).

Situações que causam desequilíbrio das defesas do organismo, como estresse, gripes alergias, entre outras, podem interferir na alteração da imunidade, alterações do meio como a diminuição do pH podem criar condições para que o fungo se multiplique causando infecções (UBALDO, 2007).

Alguns microbiologistas supõem que a *candida* possa ser encontrada na vagina, fazendo parte da sua flora normal sem ao menos causarem sintomas.

O agente causal é a *candida albicans*, respondendo 90% dos casos, podendo o restante ser devido às espécies não *albicans* (*glabrata*, *tropicalis*, *Krusei*, e *parapsilosis*) (HOLANDA et al., 2007).

A candidíase oral e a vaginal são os tipos mais comuns de infecções fungicas oportunistas.

Apesar dos avanços terapêuticos, a candidíase permanece como um frequente problema em todo o mundo, afetando todas as camadas sociais.

3.2 FATORES DE RISCO E RECORRÊNCIA

Pode-se classificar a candidíase em sintomática que é mais agressiva e que deve ser tratada, ou assintomática onde ela não apresenta resposta inata inflamatória (FERRACIN; OLIVEIRA, 2005)

A candidíase vulvovaginal pode ser classificada como complicada ou não complicada. As complicadas, não respondem a tratamentos aos azóis de curto prazo, podendo ser severa ou recorrente (JACYNTHO, 2010).

As não complicadas ocorrem em cerca de 90% das pacientes e responde à terapia antifúngica tópica ou oral de curto prazo (FERRACIN; OLIVEIRA, 2005)

Cerca de 5% das mulheres que tem candidíase vulvovaginal, desenvolvem a candidíase vulvovaginal recorrente, ou seja, quando se apresenta quatro ou mais episódios de candidíase em um ano, podendo aumentar essa incidência após a primeira menstruação (ÁLVARES; SVIDZINSKI; CONSOLARO, 2007).

A recorrência pode ocorrer quando essas pacientes apresentam uma série de fatores predisponentes, ocasionando alterações no sistema imunológico favorecendo a proliferação dos fungos.

O uso de antibióticos, contraceptivos orais, a presença de diabete mellitus, gestantes, pequenos traumas como o ato sexual, hábito de usar roupas muito justas ou de fibras sintéticas, dieta alimentar muito ácida e usuárias crônicas de corticóides podem favorecer a infecção (ROSA ; RUMEL, 2004).

A utilização de antibióticos pode piorar a infecção por *candida*, podendo suprir a flora vaginal lactobilar.

Os *lactobacillus* produzem ácido láctico a partir do glicogênio, presente no citoplasma das células escamosas, propiciando uma acidez adequada ao ambiente vaginal que é em torno de 4.5 dificultando que as leveduras sejam proliferadas, constituindo assim uma barreira defensiva (LINHARES; GIRALDO; BARACAT, 2010).

3.3 DIAGNÓSTICO CLÍNICO E LABORATORIAL

As pacientes costumam fazer seu “próprio diagnóstico”, sendo que mais da metade das mesmas erram, confundindo com outras condições como dermatites, reações alérgicas, herpes genital primário, vulvites químicas, etc. Por isso a adição do diagnóstico laboratorial é valiosa (JACYNTHO, 2010).

Para um melhor diagnóstico deve ser submetidas à avaliação padrão com medida do pH vaginal, teste de Whiff, microscopia à fresco e com hidróxido de potássio (KOH) a 10%, onde facilita a observação dos elementos fúngicos, clareando o material a ser examinado por dissolução dos grumos de células epiteliais, tornando-as transparentes, dissolvendo biócitos e hemácias, permitindo assim uma melhor visualização de hifas e esporos que adquirem aspecto intumescido (FEUERSCHUETTE et al., 2010).

Abaixo estão listados os sintomas que uma paciente possa ter diante de uma candidíase vulvovaginal clássica:

- Ardência
- Prurido
- Corrimento geralmente grumoso, sem odor.
- Disúria (ardência ao urinar)
- Dor local e/ou durante o ato sexual
- Dispareunia de intróito vaginal
- PH abaixo de 4,5

Os sinais característicos são fissuras vulvares e eritema, corrimento grumoso, com placas aderidas à parede vaginal, de cor branca, edema vulvar, escoriações e lesões satélites, por vezes, pustulosas, pelo ato de coçar (figura 1).



Figura 1: candidíase com edema de pequenos lábios e microerosões. Corrimento grumoso branco aderido à parede vaginal.

3.4 PREVENÇÃO E TRATAMENTO

3.4.1 PREVENÇÃO

Alguns ginecologistas já solicitam aos seus pacientes a mudança de hábitos, com o intuito de prevenir o aparecimento de vulvovaginites causadas por *Cândida* (JACYNTHO, 2010).

- Evitar usar roupas muito justas, ou de fibras sintéticas que possam dificultar a ventilação vulvar e vaginal.
- Usar somente lingerie de algodão.
- Evitar o uso de meia-calça, pois aumenta significativamente o aparecimento de candidíase.
- Ter uma alimentação saudável com pouca ingestão de açúcar, carboidratos e consumo frequente de iogurtes acidófilos.
- Diminuir a ingestão de alimentos ácidos que acidificam o pH vaginal
- Usar camisinha para evitar todos os tipos de vaginites.
- Fazer uma higienização apropriada regularmente da região vaginal.
- Não utilizar duchas vaginais

- Durante a gravidez a mulher deve evitar açúcar, álcool e alimentos fermentados, e adicionalmente ingerir iogurte diariamente, e moduladores imunológicos (CONSOLARO, 2009).

Ao ser constatada a doença, a paciente deve-se recorrer ao um tratamento com antifúngicos, uma alimentação balanceada, repor a microflora vaginal, com lactobacilos, evitar ter relações sexuais neste período, Deve também fazer uma higienização adequada sem fazer uso de ducha íntima (SILVA et al., 2006).

3.4.2 TRATAMENTOS

O tratamento deve ser realizado por só uma via, sendo ela oral ou vaginal, no entanto se ocorrer infecção mista, pode-se prescrever o tratamento para cada agente etiológico por cada uma das vias.

Geralmente o tratamento é baseado em dois grupos: os azóis e agentes poliênicos. Sendo que os poliênicos são representados pela nistatina e anfotericina B que são antifúngicos. Dos agentes antifúngicos azoicos, os mais comuns são cetoconazol e o miconazol, e os mais recentes são fluconazol, itraconazol, e posoconazol (SILVA et al., 2006).

A candidíase não complicada pode ser tratada com dose única ou com terapia de curto prazo com azóis ou poliênicos: ou seja, dose única de Fluconazol 150mg, ou 12/12h o Itraconazol 200 mg durante um dia, ou cetoconazol 200mg, 12/12h, 5 dias, ou esquemas mais prolongados usando Nistatina oral. Quanto aos cremes ou óvulos vaginais, temos em dose única o butoconazol a 2%, creme 5g, o clotrimazol usando de três a sete dias, miconazol, tioconazol dose única, isoconazol dose única ou sete dias, fenticonazol, ou até mesmo a Nistatina creme por quatorze dias, sendo que todos terá uma resposta semelhante (JACYNTHO,2010).

Quando a candidíase é complicada, não se deve tratar com esquemas curtos ou dose única, deve-se recorrer um esquema vaginal de sete dias, ou várias doses de fluconazol 150 mg a cada 72h.

Na gravidez não se recomenda os azóis orais, é preferível um tratamento com cremes vaginais de Nistatina por 14 dias ou clotrimazol 1% por sete dias. Se o caso

for com recorrência, pode-se utilizar Clotrimazol 500mg a cada uma a duas semanas para que os sintomas sejam controlados (FERRACIN; OLIVEIRA ,2005).

4. PROBIÓTICOS

4.1 DEFINIÇÃO

O termo probiótico foi introduzido por Lilley e Stillwell, em 1965, onde descrevia que os microrganismos desempenhavam atividades benéficas (OLIVEIRA et al., 2002).

Fuller em 1989 considerava os probióticos como suplementos alimentares que continham bactérias vivas que produziam efeitos benéficos no hospedeiro, favorecendo um equilíbrio de sua microbiota intestinal. Já Havenaar em 1992 considerava como culturas únicas ou mistas de microrganismos (SANTOS, 2010).

Probiótico derivado da língua grega e significa "pró-vida"; que se define como organismos vivos, sendo que se administrados em quantidades adequadas podem proporcionar vários benefícios à saúde (BRINGEL, 2011).

No entanto, para que seja eficaz é necessário que sejam resistentes ao suco gástrico e à bile, para que possam chegar até a microbiota e desempenhar suas funções (VARAVALLO; THOMÉ; TESHIMA, 2008).

Os alimentos funcionais têm como objetivo melhorar, manter e reforçar a saúde dos consumidores via alimentação. Os mais utilizados são bactérias dos gêneros *Lactobacillus* que são bactérias anaeróbias facultativas e *Bifidobacterium* bactérias aeróbicas estritas ou anaeróbicas (CARDOSO, 2004).

Sendo que o gênero *Lactobacillus* é composto por bacilos gram positivos, regulares e não esporulados. Possuindo morfologia celular variando de bacilos longos e finos até, como bacilos curvados e pequenos (LINHARES; GIRALDO; BARACAT, 2010).

Também pode-se definir como o uso de exclusão competitiva. A terapia ou prevenção com probióticos introduz um tipo de bactéria benéfica com intuito da diminuição de outra espécie de bactéria (BADARÓ et al., 2008).

4.2 AÇÃO

A definição de probiótico foi desenvolvida a partir de 1990. Estudos do final do século XIX, já detectavam diferenças entre a microbiota intestinal de pessoas doentes e o de pessoa saudável (SANTOS, 2010).

As bactérias probióticas (figura 2) foram estudadas na microbiota intestinal humana onde se verificou influências benéficas, mas como efeitos antagônicos, competição e efeitos imunológicos, resultando no aumento da resistência contra patógenos. Sendo assim, descobriram que a utilização de culturas probióticas estimula a multiplicação de bactérias benéficas, reforçando os mecanismos naturais de defesa (MARTINEZ, 2008). Uma das áreas de pesquisa mais importantes do mundo de alimentos funcionais está relacionada ao leite e produtos lácteos.

<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>Bifidobacterium spp.</i>	Others
<i>L. acidophilus</i> <i>L. casei</i> <i>L. crispatus</i> <i>L. delbrueckii subsp. Bulgaricus^a</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. gasseri</i> <i>L. johnsonii</i> <i>L. paracasei</i> <i>L. plantarian</i> <i>L. reuteri</i> <i>L. rhamnosus</i>	<i>B. bifidum</i> <i>B. breve</i> <i>B. infantis</i> <i>B. longum</i> <i>B. lactis</i> <i>B. adolescentis</i>	<i>Escherichia coli</i> Nissle <i>Saccharomyces boulardii</i> <i>Streptococcus thermophilus^a</i> <i>Enterococcus faecium</i>

Figura 2 – Exemplos de bactérias probióticas

As bactérias probióticas crescem lentamente no leite, sendo a prática mais comum a de adicionar as bactérias do iogurte para que haja um melhor processo de fermentação na fabricação de leites fermentados contendo probióticos (OLIVEIRA; DAMIN, 2003).

Suas principais funções são: nutricional onde faz a síntese de vitaminas do complexo B, digestória que é síntese de enzimas digestivas, sobretudo da enzima

lactase, cardiovascular que tem o papel na normalização do colesterol, metabólica e imunomoduladora (SANTOS, 2010). Outras funções estão descritas na tabela 1.

FUNÇÃO	ESPÉCIE PROBIÓTICA
Equilíbrio da microbiota intestinal	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>L.casei</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i>
Estimulo do sistema imune	<i>L.acidophilus</i> , <i>L.casei</i> , <i>L.plantarum</i> , <i>L.rhamnosus</i>
Redução de enzimas fecais	<i>L.acidophilus</i> , <i>L.casei</i> , <i>L.gasseri</i>
Ação antitumorigênica	<i>L.acidophilus</i> , <i>L.casei</i> , <i>L.gasseri</i> , <i>B.adolescentis</i> , <i>B.bifidum</i> , <i>B.longum</i>
Prevenção da diarreia dos viajantes	<i>L.acidophilus</i> + <i>B.bifidum</i>
Prevenção da diarreia pseudomembranosa	<i>L.rhamnosus</i>
Prevenção de diferentes tipos de diarreia	<i>L.acidophilus</i> , <i>L.rhamnosus</i> , <i>B.bifidum</i>
Diminuição colesterol sérico	<i>L.acidophilus</i>

Tabela 1- Funcionalidade de bactérias probióticas

Ao ser consumido, os probióticos devem estar viáveis e manter sua viabilidade após contato com ácido gástrico e com sais biliares. Assim após vencerem essa barreira química, devem se aderir a uma superfície intestinal, onde serão desempenhadas suas funções, competindo com agentes patogênicos (PEIXOTO; SILVA, 2008).

4.3 ESPÉCIES

Cerca de 56 espécies do gênero *Lactobacillus* foram descritas até hoje. No entanto estão distribuídas por vários nichos ecológicos, sendo encontradas no trato gastrointestinal e geniturinário (SANTOS, 2010). Porém esta distribuição é afetada por diversos fatores ambientais como: pH, disponibilidade de oxigênio, nível de substrato específico e presença de secreções e interações bacteriana (ISHIKAWA,2011).

Sendo que *L. acidophilus* e *L. casei* têm sido amplamente utilizados pelos laticínios para produção de leites fermentados e outros derivados lácteos.

4.3.1 *LACTOBACILLUS ACIDOPHILLUS*

São bactérias naturais do trato gastrintestinal, ácido-produtoras, que criam um ambiente desfavorável para o crescimento de fungos e outras bactérias (PHARMA PURA, 2009)

- Favorecem uma flora com característica ácida;
- Produzem ácido láctico pela fermentação de carboidratos;
- Restabelecem a flora bacteriana do trato gastrintestinal;
- Usadas como acidificante vaginal.

4.3.2 *LACTOBACILLUS CASEI*

São microrganismos anaeróbicos presentes no intestino e na boca dos seres humanos. Sobrevivem em uma larga faixa de pH e temperatura (PHARMA PURA,2009)

Sua aplicação em iogurtes tem aumentado progressivamente *Lactobacillus casei* Shirota se destaca como o ingrediente ativo do Yakult®, proporcionando evidências à redução do risco de algumas doenças

- Acidificam e protegem o intestino;
- Produzem ácido láctico, que ajuda a manter bactérias desejáveis no organismo humano;
- Ajudam no crescimento dos *L. Acidophilus*, produtor da enzima amilase (enzima digestiva), sendo assim, melhoram a digestão;
- Reduzem a intolerância ao leite;
- Presente no Yakult.

Na figura 3 pode-se visualizar o mecanismo de ação do *Lactobacillus casei*.



Figura 3 - Mecanismo de ação do probiótico: *Lactobacillus casei* (In: PEIXOTO; SILVA, 2008)

De acordo com a figura ao se ingerir um probiótico este passa por várias etapas até chegar ao intestino delgado onde os quais formam ácido láctico a partir do glicogênio, presente principalmente no citoplasma das células escamosas. Esse mecanismo

propicia inibição e eliminação das bactérias patogênicas inibindo a formação de substâncias tóxicas, podendo aumentar a motilidade intestinal proporcionando uma melhor digestão e absorção dos nutrientes, ou seja, aumentando os microrganismos de defesa.

4.4 BENEFÍCIOS

Os benefícios (figura 4) à saúde que se atribui na ingestão de culturas probióticas são: controle e estabilização da microbiota intestinal após uso de antibióticos, resistência gastrointestinal, diminuição de organismo patogênico, alívio de constipação e aumento de minerais e produção de vitaminas (ISHIKAWA, 2011).

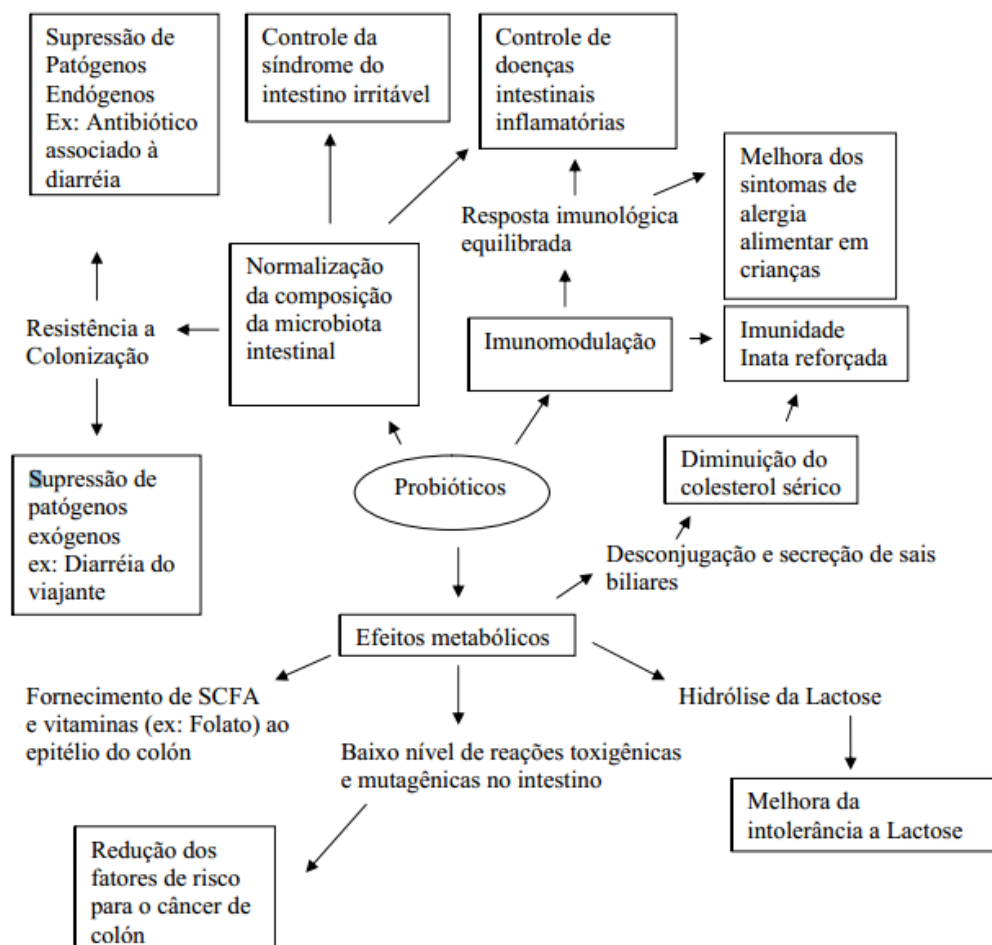


Figura 4 - Benefícios do consumo de probióticos a saúde humana

4.5 UTILIZAÇÕES DOS PROBIÓTICOS

4.5.1 INFECÇÕES UROGENITAIS

O ambiente ácido da vagina pode ser mantido pelos *Lactobacillus* como um mecanismo de defesa.

Situações como fases do ciclo menstrual, gestação, uso de contraceptivos, uso de duchas, utilização de antibióticos (SAAD,2006),podem causar desequilíbrio das defesas do organismo, ou seja uma mudança na microbiota vaginal, podendo ocasionar a redução de *Lactobacillus*, a redução da produção de peróxido de hidrogênio, modificação de pH vaginal, conseqüentemente a proliferação de outros microrganismos (figura 5) (MENDES,2009).

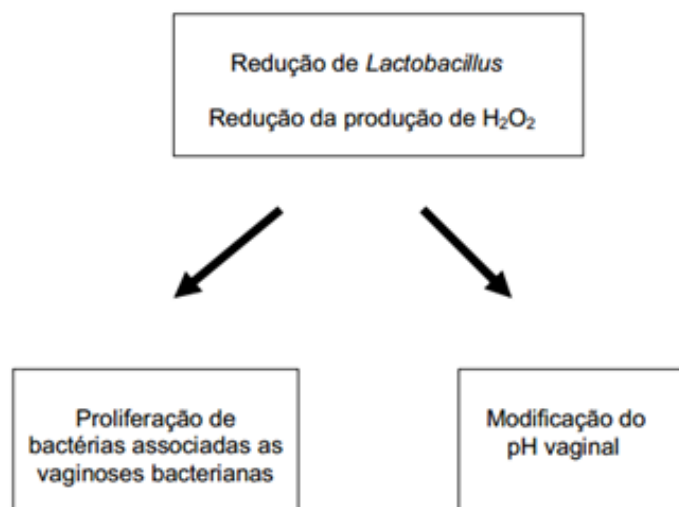


Figura 5 – Consequências da redução dos *Lactobacillus*

Para uma seleção de probióticos para aplicações urogenitais deve considerar a capacidade de estabelecimento, crescimento, e produção de componentes anti-patogênicos, incluindo o peróxido de hidrogênio, ácido láctico, e bacteriocinas, no ambiente vaginal (LINHARES; GIRALDO; BARACAT, 2010).

5. VERIFICAÇÃO DA COMPETIÇÃO ENTRE MICRORGANISMOS

5.1 MÉTODO DE DISCO DIFUSÃO

O teste de sensibilidade aos antimicrobianos é uma das provas mais importantes do laboratório de microbiologia clínica, pois avalia a sensibilidade dos microrganismos contra diferentes agentes antimicrobianos.

Foi descrito em 1966 por Bauer e Kirby, sendo um método de sensibilidade simples e confiável.

Baseia-se na difusão, através do ágar de um antimicrobiano impregnado em um disco de papel-filtro. A difusão do antimicrobiano leva à formação de um halo de inibição do crescimento bacteriano (figura 6), cujo o diâmetro é inversamente proporcional a concentração inibitória mínima (ANVISA, 2011).

O halo de inibição do crescimento bacteriano ao redor de cada disco é mensurado em milímetros. Assim são relacionados à sensibilidade da amostra bacteriana e à velocidade de difusão do antimicrobiano no ágar. Quando os halos de inibição são correlacionados aos valores logarítmicos da concentração inibitória mínima (DIOGO et al., 2010)

Na prática, os resultados do teste de disco-difusão são interpretados comparando o valor do halo de inibição com os critérios publicados pelo CLSI. Esse método é qualitativo, ou seja, pode classificar as amostras bacterianas em sensíveis, resistentes ou intermediárias (ANVISA, 2011)

Na maioria das situações clínicas, o teste qualitativo é suficiente para orientar a escolha terapêutica. Suas vantagens é fácil execução, reprodutibilidade, utilização de reagentes de baixo custo, fácil interpretação clínica, flexibilidade quanto à escolha dos antimicrobianos e a não exige equipamentos especiais (SEJAS et al., 2002)

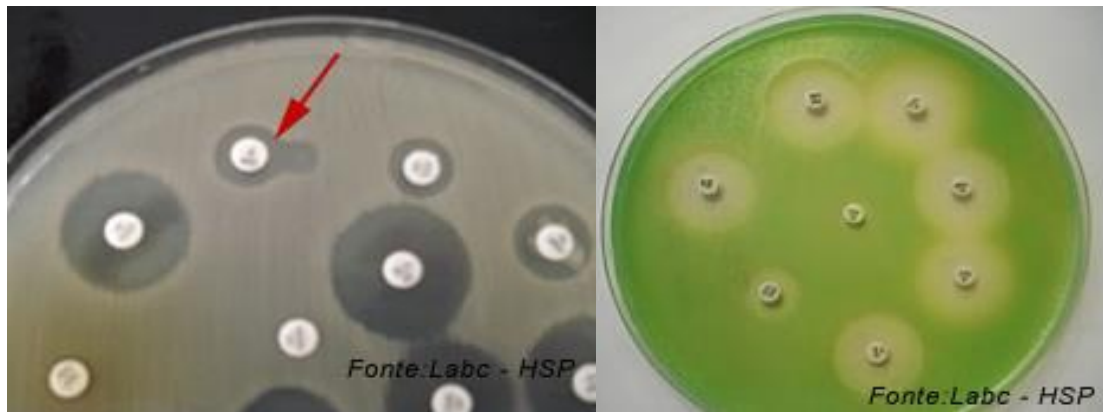


Figura 6 – Teste de sensibilidade pelo método disco-difusão (In: ANVISA, 2011)

6. APLICAÇÃO NO ENSINO MÉDIO

É importante incorporar ao processo educacional vigente nas escolas discussões sobre sexualidade nos seus mais diversos enfoques, contribuindo para a discussão deste tema com abordagens químicas, físicas e biológicas que vão além das realizadas em seminários específicos sobre AIDS e sexualidade (SAMRSLA; DEL PINO, 2001).

Atualmente, o número de jovens que entram na vida sexual antes do momento adequado, esta cada vez maior.

E é por essa razão que a escola deve orientar esses adolescentes sobre os riscos que estão expostos numa relação sexual precoce: Gravidez indesejada, doenças sexualmente transmissíveis. A relação sexual é apenas uma das formas de expressão da sexualidade e a adolescência é o momento em que a sua experimentação tem início. Sendo assim, é relevante expor o conceito de adolescência (RIBAS, 2008).

Objetivo principal é informar e conscientizar os adolescentes da existência das doenças sexualmente transmissíveis e dos perigos de uma relação sexual sem prevenção.

Pode ser aplicada também uma aula sobre fungos sendo ela teórica juntamente com a prática, para que os alunos possam perceber que fungos e bactérias existem em todos os lugares. Ao encontrar um ambiente capaz de fornecer nutrientes e condições para o desenvolvimento, os microrganismos se instalam e aparecem.

Pode-se aplicar uma teoria com as características, estruturas, desenvolvimento, reprodução e as formas do uso humano dos tipos de organismo.

A aula teria o objetivo de uma maior participação dos alunos, despertando dos mesmos um grande interesse contribuindo assim para uma maior aprendizagem e desenvolvimento.

Aula pratica: Cultivando bactérias

Material (para o meio de cultura)

1 pacote de gelatina incolor

1 xícara de caldo de carne

1 copo de água

Dissolver a gelatina incolor na água, conforme instruções do pacote. Misturar ao caldo de carne

Material (para a experiência)

Duas placas de petri (ou duas tampas de margarina ou dois potinhos rasos), com o meio de cultura cobrindo o fundo

Cotonetes

Filme plástico

Etiquetas adesivas

Caneta

Procedimento

Os alunos passam o cotonete no chão ou entre os dentes, ou ainda entre os dedos dos pés. Há ainda outras opções, como usar um dedo sujo ou uma nota de 1 real. O cotonete é esfregado levemente sobre o meio de cultura para contaminá-lo. Tampe as placas de petri ou envolva as tampas de margarina com filme plástico. Marque nas etiquetas adesivas que tipo de contaminação foi feita. Depois de três dias, observe as alterações.

7. MATERIAIS E MÉTODOS

7.1 MATERIAIS

Alça de Drigalski

Autoclave

Balança Analítica

Bastão de Vidro

Becker

Disco de papel filtro

Erlenmeyer

Estufa

Pinça

Pipeta graduada de 10 ml

Placas de Petri

7.2 REAGENTES

Água destilada

BHI - Brain Heart Infusion (Oxoid)

Cepa *Candida Albicans*

Fluconazol (comprimido)

Iogurte Natural

Nitrato de Miconazol (pomada)

PCA- Plate Count Agar (Himedia)

Sabonete Íntimo

Yakult

7.3 MÉTODO

7.3.1 AQUISIÇÃO E REATIVAÇÃO DA CANDIDA

A amostra de *Candida Albicans* foi cedida pelo departamento de microbiologia do hospital universitário de Londrina. Para reativação da amostra foi colocada em ágar nutriente ficando incubada a 37°C por 24 horas.

7.3.2 PREPARO DOS MEIOS DE CULTURA

As análises foram realizadas com dois tipos de ágar BHI e PCA sendo utilizados os mesmo procedimentos para cada meio.

Pesou-se 9.4g de meio BHI em um Becker de 250 ml, adiciono-se 200 ml de água destilada e com o auxilio de um bastão de vidro homogenizou-se e transferiu-se a solução para um erlenmeyer. Os meios e os discos de papel filtro foram autoclavados por 15 minutos, após o resfriamento dos meios foram transferidos para a placa de petri em duplicata.

7.3.3 INOCULAÇÃO DO MICRORGANISMO

Dentro de 15 minutos após o ajuste do inóculo, pipetou-se 0,1 ml de cultura *candida albicans* e semeou-se uniformemente com auxilio de alça de drigalski estéril em três direções diferentes. Deixar a placa semeada secar por 5 minutos à temperatura ambiente, para que o inóculo seja completamente absorvido pelo ágar.

7.3.4 TESTE DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO DA CANDIDA

7.3.4.1 TESTE COM YAKULT®

Para análise com probiótico yakult ®, com o auxílio de uma pinça molhou-se os disco de papel filtro no yakult ® e transferiu-se os disco de papel filtro com amostra para a placa com ágar BHI e para as placas com ágar PCA, cada amostra foram realizadas em duplicata.

7.3.4.2 TESTE COM IOGURTE NATURAL

Para análise com probiótico iogurte natural, com o auxílio de uma pinça molhou-se os disco de papel filtro no iogurte natural e transferiu-se pra placa com ágar BHI e para as placas com ágar PCA.

7.3.4.3 TESTE COM NITRATO DE MICONAZOL

Além de correlacionar com o teste de sensibilidade, ou seja, de maneira a comparar se os probiótico eram eficazes na inibição de crescimento candida também foi testada a sensibilidade da levedura ao nitrato de miconazol pomada.

Com o auxílio de uma pinça molhou-se os disco de papel filtro na pomada miconazol e transferiu-se os discos de papel filtro com a amostra para placa com ágar BHI e para as placas com ágar PCA.

7.3.4.4 TESTE COM FLUCONAZOL

Análise da sensibilidade da levedura *candida albicans* ao fluconazol comprimido.

Abriu-se a cápsula usando somente a substância em pó, sendo transferida para um tubo de ensaio e dissolvida em água deionizada estéril, com o auxílio de uma pinça molhou-se os disco de papel filtro na amostra e transferiu-se para a placa com ágar BHI e para as placas com ágar PCA.

7.3.4.5 TESTE COM SABONETE ÍNTIMO

Análise da sensibilidade da levedura *candida albicans* ao sabonete íntimo. Com o auxílio de uma pinça molhou-se os disco de papel filtro na amostra de sabonete íntimo e transferiu-se para a placa com ágar BHI e para as placas com ágar PCA.

7.3.5 INCUBAÇÃO E VERIFICAÇÃO DOS RESULTADOS

Após todas as amostras estarem prontas nas placas transferiu-se para estufa ficando incubadas em temperatura 37°C por 48 horas. Após as 48 horas verificou-se o halo de inibição e com auxílio de uma régua foram realizadas as medições dos halos, podendo observar a sensibilidade do microrganismo a substancia antimicrobiana.



8. RESULTADO E DISCUSSÃO

O teste de sensibilidade avalia a sensibilidade dos microrganismos contra diferentes agentes antimicrobianos, baseia-se na difusão, através do ágar de um antimicrobiano impregnado em um disco de papel-filtro, levando à formação de um halo de inibição do crescimento bacteriano. (ANVISA, 2011)

O teste in vitro teve como objetivo eliminar as dúvidas em relação à ação antifúngica dos probióticos. Além de correlacionar com o teste de sensibilidade, ou seja, de maneira a comparar se os probióticos eram eficazes na inibição completa de crescimento de *Candida* tanto quanto a sensibilidade da levedura ao sabonete íntimo, fluconazol e miconazol. (tabela 1). Também foi possível observar que com o meio PCA houve melhor visualização do halo quando comparado com o meio de cultura BHI.

	Meio BHI	Meio PCA
Pomada Nitrato de miconazol	1 mm	4 mm
Sabonete Íntimo	3 mm	5 mm
Yakult	4 mm	4 mm
Fluconazol	1 mm	4 mm
logurte	3mm	1mm

Tabela 1: Resultados do halo de cada uma das amostras

A partir dos resultados, podemos visualizar a presença de halo na placa no qual contém Yakult® (figura 7), sendo assim podemos verificar que a espécie da levedura candida é inibida pelos probióticos Yakult®.

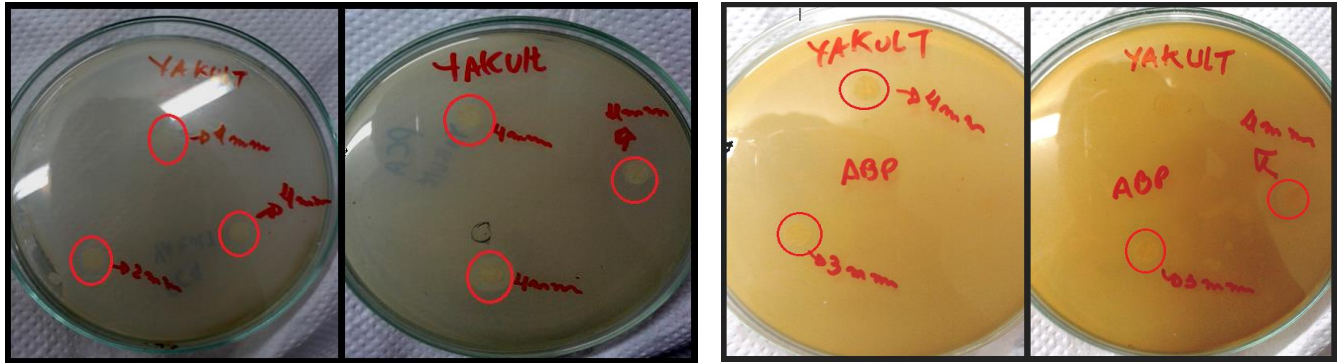


Figura 7- Amostra Yakult em meio PCA e BHI

Na placa contendo iogurte natural podemos verificar a presença do halo (figura 8), assim podemos relatar que a espécie da levedura candida é inibida pelos probióticos. Há relatos na literatura que os lactobacillus são microrganismos naturais do trato gastrointestinal, ácido-produtoras, que criam um ambiente desfavorável para o crescimento de fungos e outras bactérias (PHARMA PURA, 2009). Assim podemos verificar que o consumo destes produtos podem inibir o crescimento de outros microrganismos como candida.

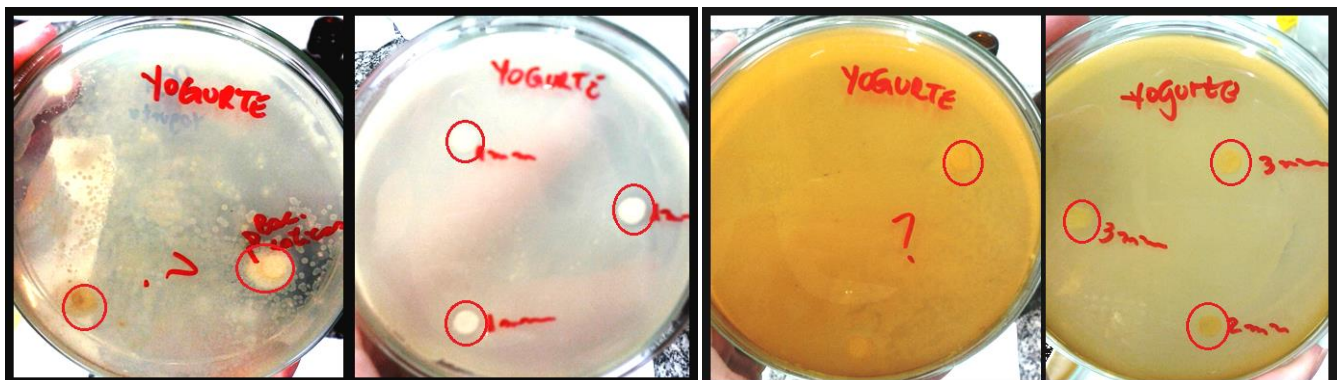


Figura 8 - Amostra Iogurte Natural meio PCA e BHI

Nos testes observamos que o sabonete íntimo (figura 9) também apresentou halo de inibição, assim como o miconazol pomada (figura 10), indicando assim que estes produtos ajudam a combater a candida no local, porém ao ser constatada a doença, a paciente deve recorrer ao um tratamento com antifúngicos, uma alimentação balanceada, repor a microflora vaginal, com lactobacillus e fazer uma higienização adequada sem fazer uso de ducha íntima (SILVA et al., 2006).

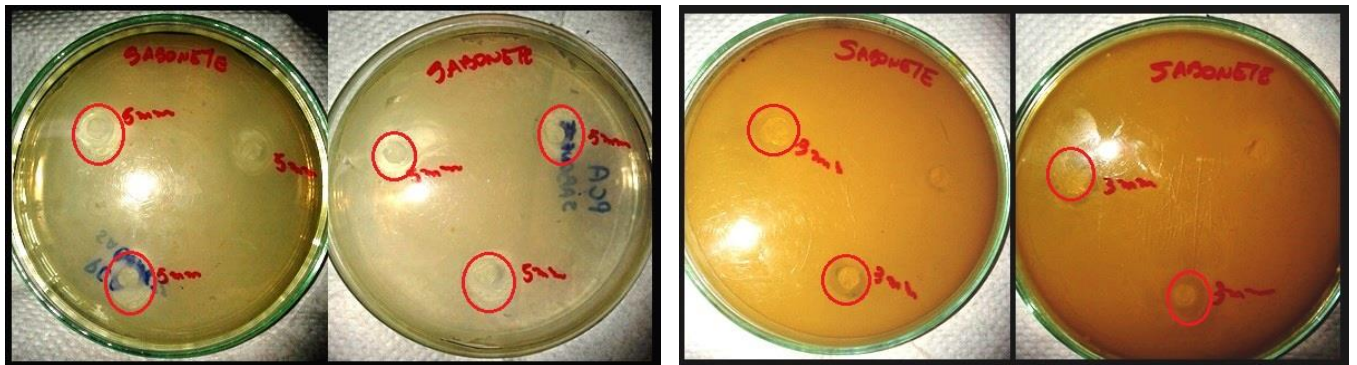


Figura 9 - Amostra Sabonete em meio PCA e BHI

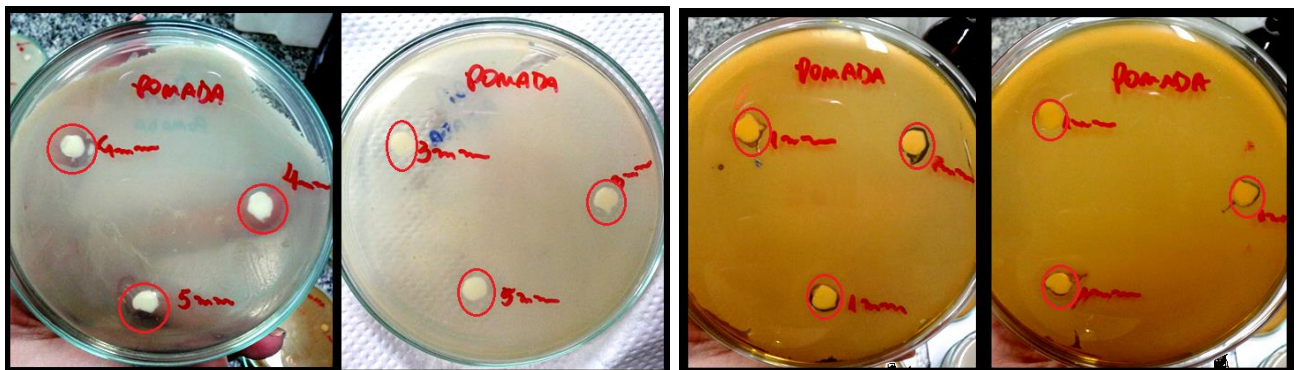


Figura 10 - Amostra miconazol em meio PCA e BHI

No caso do Fluconazol, não houve a presença de halo de inibição. Sendo que o fármaco apresenta pouca solubilidade em água, tendo uma fácil solubilidade em metanol, clorofórmio e ácido acético (COELHO,2004). Neste caso não podemos indicar que este medicamento não inibe o crescimento da candida, pois quando

fizemos a diluição do comprimido em água estéril, não houve solubilidade satisfatória, o que interferiu nos resultados.

Como o objetivo foi verificar a ação dos probióticos, não repetimos a análise para o fluconazol.



Figura 11 - Amostra Fluconazol em meio PCA e BHI

9. CONCLUSÃO

Conclui-se então que os probiótico testados foram eficazes na redução da prevalência de *candida albicans*. A capacidade dos probióticos em reduzir a levedura independe da espécie de candida, assim como pH e condição de higiene. Portanto, a utilização dos probióticos pode ser indicada como método preventivo contra infecções oportunistas causadas por este microrganismo.

Nos testes in vitro, as amostras de iogurte, Yakult, sabonete e pomada apresentaram halo de crescimento, indicando que todos possuem capacidade de inibição, possuindo assim ação antifúngica. O Sabonete apresentou a maior inibição, seguido do Yakult, miconazol e iogurte. O fluconazol apresentou baixa inibição. Vale ressaltar que ao ser testado o comprimido de fluconazol apresentou pouca solubilidade em água.

REFERÊNCIAS

ÁLVARES, Cassiana Aparecida; SVIDZINSKI, Terezinha Inez Estivalet; CONSOLARO, Márcia Edilaine Lopes. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes, do hospedeiro e virulência das leveduras. **Revista Brasileira de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 5 • outubro, 2007, 319-327 p.

BADARÓ, Andréa Cátia Leal; GUTTIERRES, Ana Paula Muniz; REZENDE, Ana Carolina Valente; STRINGHETA, Paulo César. Alimentos Probióticos: Aplicações como Promotores da Saúde Humana-parte 1. NUTRIR GERAIS - **Revista Digital de Nutrição**, V. 2, n. 3, Ago./Dez. 2008.

BARBEDO, Leonardo S; SGARBI, Diana BG. **Candidíase**, Niterói: 2010.

BRINGEL, Adenilde. **Experimentos realizados no Brasil demonstram que algumas espécies de microrganismos podem combater a candidíase oral**, Disponível em:<<http://www.yakult.com.br/yakult/default.aspx?c=334>> Acesso em: 2011.

COELHO, Helenilze; MATINATTI, Audrei Nunes Fernandes; ARAÚJO, Magali Benjamim de; BERGOLD, Ana Maria; BUENO, Francie: Análise químico-farmacêutica do fluconazol e especialidade farmacêutica cápsula. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol. 40, n. 2, abr./jun., 2004

CARDOSO, Bárbara Cachada. **Efeito de antifúngicos em suspensões e biofilmes de Candida albicans e Candida dubliniensis**, 2004.85p. Dissertação (Mestrado) – Engenharia de Bioprocessos - Universidade do Minho, Braga, 2004.

CONSOLARO, Márcia Edilaine Lopes. **Candidíase Vulvovaginal - Tratamento e prevenção**. Idmed. Disponível em:< <http://idmed.terra.com.br/saude-de-a-z/indice-de-doencas-e-condicoes/candidiase-vulvovaginal/tratamento-e-prevencao.html>>. Acesso em: 29 de Julho de 2009.

CORRÊA, Paula dos Reis; DAVID, Paulo Rodrigo dos Santos; PERES, Nathália Perpétua; CUNHA, Keith Cássia da; ALMEIDA, Margarete Teresa Gottardo de. Caracterização fenotípica de leveduras isoladas da mucosa vaginal em mulheres adultas. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.31, n4, abril, 2009.

SAMRSLA, Vander Edier Ebling, DEL PINO, José Claudio. Camisinha na escola: Saúde, Sexualidade e construção de conhecimento a partir de testes de qualidade. **Revista Química Nova na escola**. n. 13, mai. 2001.

DIOGO, Hilda Conceição; MELHEM, Márcia; SARPIERI, Aldo; PIRES, Mario Cezar. Avaliação do método de disco-difusão para determinação da eficácia da terbinafina in vitro em agentes de micoses superficiais e subcutâneas. **An Bras Dermatol**. 2010,324-330p.

FERRACIN, Ingryt; OLIVEIRA, Rúbia Maria Weffort de. Corrimento vaginal: Causa Diagnóstico e Tratamento Farmacológico. **Infarma** v.17, nº 5/6, 2005,82-86p.

FEUERSCHUETTE, Otto Henrique May, SILVEIRA, Sheila Koettker; FEUERSCHUETTE, Imoto; CORRÊA, Tiago; GRANDO, Leisa; TREPANI, Alberto. **Candidíase vaginal recorrente: manejo clínico**, janeiro, 2010.

HOLANDA, Antônio Arildo Reginaldo de; FERNANDES, Ana Cristina Santos; BEZERRA, Christiane Medeiros; FERREIRA, Maria Ângela Fernandes; HOLANDA, Manoel Reginaldo Rocha de; HOLANDA, Julita de Campos Pipolo; MILAN, Eveline Pipolo. Candidíase vulvovaginal: sintomatologia, fatores de risco e colonização anal concomitante, **Revista Brasileira Ginecologia Obstetricia**. 2007,3-9p.

ISHIKAWA, Karin Hitomi. **Utilização de probióticos para o controle da prevalência de cândida oral em pacientes edentados totais**, 2011,46p. Tese (doutorado) – Faculdade de Odontologia - Sp, São Paulo,2011.

JACYNTHO, Cláudia. **Vulvovaginites**, 2010,1- 42p, Trabalho conclusão de curso, UNICAMP, Rio de Janeiro.

LINHARES, Iara Moreno; GIRALDO, Paulo Cesar; BARACAT, Edmund Chada. Novos conhecimentos sobre a flora bacteriana vaginal. **Revista da Associação Médica Brasileira**, vol.56, n.3, São Paulo, 2010.

MARTINES, Rafael Chacon Ruiz. **Efeito da utilização de culturas lácticas probióticas na microbiota vaginal de pacientes acometidas por infecções bacterianas e fúngicas**, 2008,85p. Tese (doutorado)- Biociências Aplicadas à farmácia- Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, SP, Ribeirão Preto, 2008.

MENDES, Alexandra. **O Uso de Probióticos na Saúde Humana**. 2009.49p. Monografia-Nutrição-Universidade do Porto, Porto, 2009.

MENDES, Carina Lucena; ARAÚJO, Ana Albertina de; SENA, Kêsia Xisto da Fonseca R. de ;CHIAPPETA, Alda de Andrade. **Prevalência de *Cândida sp.* Em infecções vaginais**. Edição 68, Recife, 2005.

OLIVEIRA Maricê N. DAMIN, M. Regina. Efeito do teor de sólidos e da concentração de sacarose na acidificação, firmeza e viabilidade de bactérias do iogurte e probióticas em leite fermentado. **Ciência Tecnologia de Alimento**. v.23, dezembro, 2003.

OLIVEIRA, Maricê Nogueira de; SIVIERI, Kátia; ALEGRO João Henrique Alarcon; SAAD, Susana Marta Isay. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira Ginecologia Obstetrícia**. V.38, nº 1, 2002.

PHARMA PURA, farmácia de manipulação. Disponível em:
<http://www.pharmapura.com.br/samba/index.php?option=com_content&view=article&id=142:lactocacillus&catid=52:artigos&Itemid=64&lang> Acesso em: 24 Set. 2009

PEIXOTO, Larissa Lopes; SILVA, Rodrigo Peixoto de Paula e. **OS EFEITOS DOS PROBIÓTICOS E PREBIÓTICOS NA PROMOÇÃO DE UM ORGANISMO SAUDÁVEL**. 2008.45p. Monografia- Nutrição-Universidade Presidente Antonio Carlos-UNIPAC, MG, Teófilo Otoni, 2008.

RIBAS, Taíssa Roberta. **Doenças sexualmente transmissíveis: Por que preveni-las?**, 2008.59p. Trabalho de conclusão de curso- Universidade tecnológica do paraná- PR Curitiba, 2008.

ROSA, Maria Inês; RUMEL, Davi. Fatores Associados à Candidíase Vulvovaginal: Estudo Exploratório. **Revista Brasileira Ginecologia Obstetrícia** v. 26, nº 1, 2004,65-70p.

SAAD, Susana Marta Isay. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, n.1, jan./mar. 2006.

SANTOS, Anna Carolina Accioly Lins. **Uso de Probióticos na recuperação da flora intestinal**. 2010.1-39p. Monografia- Curso de especialização em terapia nutricional- Universidade do estado do rio de janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

SEJAS, Lilian M. Sejas; SILBERT, Suzane; REIS, Adriana O. ;SADER, Hélio S. Avaliação da qualidade dos discos com antimicrobianos para testes de disco-difusão disponíveis comercialmente no Brasil. **Revista Brasileira de Patologia e Medicina Laboratorial**,v.39,n.1,jun.2002.

SILVA, Daniel Rodrigues; FERRAZ, Caio Mário Leal; NETO, Braz Batista Pereira; PARREIRA, Douglas Silva; LUIZ, Wanessa Soares. A Candidíase na bibliografia: Um panorama Sintético. **Revista multidisciplinar do nordeste mineiro**, 1-16p.

NOLETO, Dario. **Manual de controle das Doenças sexualmente transmissíveis DST**, 4ª Edição, Brasília: 2006.

ANVISA, Manual de Controle Interno da Qualidade para Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos. Disponível em:
<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/9076c4804902d2ada6d3be466b74119d/manual_testes_antimicrobianos.pdf?MOD=AJPERES> Acesso em: 10 nov. 2011

UBALDO, Luiz Augusco Sáfadi. **Ocorrência de vaginites por Cândida spp.** 2007.1-44p. Monografia-microbiologia-UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, Belo Horizonte, 2007.

VARAVALLO, Maurilio Antônio; THOMÉ, Julia Nigro; TESHIMA, Elisa. Aplicação de bactérias probióticas para profilaxia e tratamento de doenças gastrointestinais. **Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 29, n. 1, 2008, 83-104p.