

UNIVERSIDADE SAGRADO CORAÇÃO

MAIARA GONÇALVES PEREIRA

**ATIVIDADE INIBITÓRIA DO PROBIÓTICO
Lactobacillus casei CEPA *Shirota* PRESENTE NO
PRODUTO LÁCTEO *YAKULT*[®] TRADICIONAL E
YAKULT[®] 40 SOBRE CEPA DE *Candida albicans* PELA
TÉCNICA DE MACRODILUIÇÃO.**

BAURU
2010

MAIARA GONÇALVES PEREIRA

**ATIVIDADE INIBITÓRIA DO PROBIÓTICO
Lactobacillus casei CEPA *Shirota* PRESENTE NO
PRODUTO LÁCTEO *YAKULT*[®] TRADICIONAL E
YAKULT[®] 40 SOBRE CEPA DE *Candida albicans* PELA
TÉCNICA DE MACRODILUIÇÃO.**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde como parte dos requisitos para obtenção do título de Farmacêutico, sob orientação da Profa Dra Silvana Torossian Coradi.

BAURU
2010

P4366a	<p data-bbox="531 1503 847 1529">Pereira, Maiara Gonçalves</p> <p data-bbox="531 1570 1299 1731">Atividade inibitória do probiótico <i>Lactobacillus casei</i> cepa Shirota presente no produto lácteo Yakult Tradicional e Yakult 40 sobre cepa de <i>Candida albicans</i> pela técnica de macrodiluição / Maiara Gonçalves Pereira -- 2010. 25f. : il.</p> <p data-bbox="568 1771 1169 1798">Orientadora: Profa. Dra. Silvana Torossian Coradi.</p> <p data-bbox="531 1839 1299 1901">Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Sagrado Coração - Bauru - SP.</p> <p data-bbox="531 1942 1299 2004">1. <i>Candida</i>. 2. Probiótico. 3. <i>Lactobacilo</i>. 3. Vaginal. 4. Infecção. I. Coradi, Silvana Torossian. II. Título.</p>
--------	---

MAIARA GONÇALVES PEREIRA

**ATIVIDADE INIBITÓRIA DO PROBIÓTICO *Lactobacillus casei* CEPA
Shirota PRESENTE NO PRODUTO LÁCTEO YAKULT®
TRADICIONAL E YAKULT® 40 SOBRE CEPA DE *Candida albicans*
PELA TÉCNICA DE MACRODILUIÇÃO.**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde como parte dos requisitos para obtenção do título de Farmacêutico, sob orientação da Profa Dra Silvana Torossian Coradi.

Banca examinadora:

Profa Dra Silvana Torossian Coradi
Universidade do Sagrado Coração

Profa Dra Eliane Maria Ravasi Estéfano Simionato
Universidade do Sagrado Coração

Prof Dr Paulo Henrique Weckwert
Universidade do Sagrado Coração

Bauru, 16 de dezembro de 2010

Dedico este trabalho á minha mãe, meu padrasto e minha irmã, que foram e sempre serão os exemplos de toda a minha vida. A minha tia Sirlei que sempre presente me incentivou e deu força nos momentos mais difíceis, a todos os meus familiares que me apoiaram e mesmo distantes torciam para que mais uma etapa fosse conquistada. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Universidade do Sagrado Coração, que possibilitou a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Biologia da Universidade pelo apoio e estruturas oferecidos.

Ao Prof Dr Paulo Henrique Weckwert pelo auxílio e informações fornecidas.

À Profa Dra Eliane Maria Ravasi Stéfano Simionato pela colaboração durante as pesquisas para realização do trabalho.

À Ana Carolina Falcade e Tamiris Ferrarezi pelo auxílio e boa vontade durante a realização das atividades práticas, mesmo por amizade e sem nenhum benefício, e até quando suas atividades eram deixadas de lado.

Às minhas queridas e amadas amigas Bruna da Cruz Franco e Letícia Ázar que me deram todo apoio e incentivo a cada momento de fraqueza, que me estimularam e estavam ao meu lado mesmo quando eu não poderia estar ao lado delas.

Ao Silas Volpon de Mello mais conhecido como Déli que tanto colaborou para realização das tabelas.

À Bibliotecária Eliane A. Borba que auxiliou na confecção da parte metodológica do trabalho.

Enfim agradeço a todos que mesmo em pensamento torceram para que este trabalho fosse concluído. Obrigada!

AGRADECIMENTO PRIMORDIAL

Agradeço com todos os exageros possíveis a minha querida orientadora Profa Dra Silvana Torossian Coradi, primeiramente por ser um exemplo maravilhoso de pessoa e profissional. Agradeço também por toda a paciência, dedicação e compreensão, por todas as horas disponibilizadas, e principalmente por ter confiado em mim para transmitir seus conhecimentos. Agradeço por dispor de seu ilustre nome para engrandecer esse trabalho e por ser alguém de quem não terei receio em seguir sempre. Agradeço por estar sempre me guiando, e por sua magnífica sinceridade em todos os aspectos, obrigada pelos conselhos não só acadêmicos, mas também pessoais que foram decisivos em grandes momentos durante esses quatro anos. Obrigada por ter feito parte da minha vida, e por ter me deixado fazer parte da sua!

"O mundo não é feito de arco íris. É um lugar ruim e duro. E não importa o quão forte você seja a vida vai colocá-lo de joelhos e vai deixá-lo lá. Ninguém vai te bater mais forte do que a vida, e enquanto você apanha, tenta bater de volta. Mas não importa como você bate e sim o quanto consegue apanhar e continuar levantando...o quanto pode suportar e seguir em frente. É assim que se ganha. Se tem valor, busque o que é digno de você. Você tem que estar disposto a apanhar e não levar dedo na cara dizendo que não é bom o bastante ou que isso não é o que deseja. COVARDES fazem isso"

(SYLVESTER STALLONE - Rocky Balboa "Rocky VI")

RESUMO

Candidíase uma das doenças mais comuns entre as mulheres, é causada pelo fungo do gênero *Candida*. O uso indiscriminado de antifúngicos e antibióticos tem levado a um aumento de casos e de resistência por parte dos micro-organismos invasores, um medicamento alternativo, mais, simples, menos, oneroso e eficaz permitiria uma maior adesão ao tratamento. Diante da freqüente ocorrência de candidíase vaginal por *Candida* sp, em especial *C. albicans*, e da falta de novos fármacos, o uso de terapias preventivas ou alternativas pode ser uma escolha satisfatória, e entre essas, a utilização de produtos probióticos. Probióticos são considerados alimentos funcionais, que podem ser dietéticos ou suplementos alimentares, com função de atuar de forma benéfica na saúde humana. Estudos tem sugerido que os probióticos atuam favorecendo o reforço da barreira protetora de mucosa, modulando a resposta imunológica e por antagonismo de agentes patogênicos, pela produção de antimicrobianos ou através da concorrência pelos sítios de ligação. Os micro-organismos mais utilizados como probióticos são os lactobacilos, produtores de ácido láctico. O objetivo desse trabalho foi avaliar a real inibição do probiótico sobre leveduras do gênero *Candida*, o experimento demonstrou resultados positivos, que mesmo sutis, comprovam atividade inibitória no crescimento da levedura, *in vitro*, e podemos considerar que um possível mecanismo de ação do probiótico seja por competição de nutrientes ou secreção de produtos inibidores da proliferação do fungo, uma vez que não se observou alteração no pH do meio, tanto no grupo controle como no grupo tratado com o probiótico. Outros estudos são necessários para se determinar quais são essas substâncias, mas de qualquer modo, a utilização de alimento probiótico parece favorecer também uma melhor proteção da mucosa vaginal contra essas leveduras.

Palavras chave: *Candida*, lactobacilo, probiótico, infecção, vaginal.

ABSTRACT

Candidiasis of the most common diseases among women, is caused by fungus of the genus *Candida*. The indiscriminate use of antibiotics and antifungals has led to an increase in cases and resistance by the invading microorganisms, an alternative medicine, more simple, less costly and would allow for more effective compliance. Given the frequent occurrence of vaginal candidiasis with *Candida* sp, especially *C. albicans*, and the lack of new drugs, the use of preventive therapies or alternatives can be a satisfactory alternative, and among these, the use of probiotic products. Probiotics are considered functional foods, which may be dietary or food supplements, according to acting in a manner beneficial to human health. Studies have suggested that probiotics act favoring the enhancement of mucosal protective barrier, modulating the immune response and antagonism of pathogens by producing antibiotics or by competition for binding sites. The most common microorganisms used as probiotics are lactobacilli producing lactic acid. The aim of this study was to evaluate the actual inhibition of probiotic on *Candida* species, the experiment showed positive results, even subtle, show inhibitory activity on growth of yeast, in vitro, and we can consider that a possible mechanism of action of probiotics is competition for nutrients or secretion of inhibitors of proliferation of the fungus, since there was no change in pH, both in the control group as in the group treated with probiotics. Further studies are needed to determine what substances, but in any case, the use of probiotic food also seems to favor a better protection of the vaginal mucosa against these yeasts.

Keywords: *Candida*, Lactobacillus, probiotic, infection, vaginal

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 3. Crescimento de colônias a partir de inóculo obtido do sedimento do produto lácteo *Yakult*® Tradicional (A), e do tipo 40 (B), em ágar sangue, crescimento de bactérias probióticas. 21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação de número de levedura do gênero *Candida albicans*, sob atividade inibitória do probiótico *Yakult*®, tradicional e tipo 40, nos diferentes tempos. 19

Tabela 2. Relação de variação do pH em meio contendo levedura do gênero *Candida albicans*, sob ação do probiótico *Yakult*®, tradicional e tipo 40, nos períodos de 24, 48 e 72 horas. 20

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVOS.....	18
2.1 Objetivos gerais.....	18
2.2 Objetivos específicos.....	18
3 MATERIAL E MÉTODO.....	19
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	24
6 REFERÊNCIAS.....	25

1 INTRODUÇÃO

Candidíase vaginal é uma doença cada vez mais frequente entre as mulheres, mesmo sendo tão presente no cotidiano feminino é ainda causa de muitas dúvidas. Diversas pesquisas mostram constante elevação na incidência dessa doença, mas os tratamentos utilizados são restritos e nem sempre satisfatórios.

O gênero *Candida* foi criado para substituir o termo *monilia* durante o 9º Congresso Internacional de Botânica, realizado no Canadá em 1959. O gênero *Candida* pertence à família *Cryptococcaceae*, e é constituído de aproximadamente 200 espécies diferentes, dessas, 41 estão associadas a doença em humanos, sendo as mais comuns, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. pseudotropicalis*, *C. guilliermondii* (LACAZ et al., 1998; ALVARES et al., 2007, TRABULSI, 2005).

Candida sp são leveduras classificadas como fungo gram positivo, saprófita ou de vida parasitária, possuem célula globosa, ovóide, cilíndricas ou alongadas e algumas vezes irregulares, com formação de pseudo-hifas e blastóporos que se formam a partir de pseudomicélios (LACAZ et al., 1980).

Essas leveduras podem ser isoladas em diferentes locais no ser humano, tais como orofaringe, cavidade bucal, dobras de pele, secreções brônquicas, vagina, urina e fezes, e em condições de normalidade fisiológica colonizam o corpo humano sem causarem maiores sintomas (DAVIS et al., 1979; LEVINSON et al., 1998; ALVARES et al., 2007). A contaminação humana pode ocorrer no momento do nascimento, pelo parto vaginal, constituindo um dos únicos meios de transmissão que se dá de pessoa a pessoa (DAVIS et al., 1979), por outro lado há indícios de que a presença de leveduras do gênero *Candida* no solo e na água é devida a contaminação por dejetos humanos e de animais (TRABULSI, 2005).

Muito embora possam estar presente na biota normal da pele e do trato digestório, podem causar doença em pacientes imunocompetentes e imunodeprimidos, com comportamento de micose oportunista. Micoses oportunistas são infecções causadas por fungos de baixa virulência, que convivem de forma pacífica com o hospedeiro, que ao encontrar condições favoráveis, como alterações no sistema imunológico desenvolvem seu poder patogênico invadindo os tecidos (TRABULSI, 2005; ALVARES et al., 2007).

O diagnostico provisório de *Candida* sp é feito através da demonstração microscópica de abundantes hifas e células leveduriformes no raspado das lesões, que será confirmado através da cultura do micro-organismo (DAVIS et al., 1979). Há presença de hifas septadas,

com espaços entre os septos; os blastoconídeos aparecem próximos aos septos e são arredondados ou ovalados (TRABULSI, 2005).

Estes micro-organismos podem fazer parte da biota vaginal, e são encontrados sem estarem relacionados a vaginites fúngicas em 10% das mulheres na pré-menopausa, 5 a 10% nas mulheres na menopausa e até 30 % nas gestantes (BOATTO et al., 2006), entretanto é causa muito comum de doença vaginal, atingindo cerca de 95% das mulheres com pelo menos um episódio durante a vida adulta (LANCHA et al., 2003). Outro estudo realizado por Rosa & Rumel (2004) demonstrou que 55,7% das mulheres terão ao longo de suas vidas pelo menos um episódio de vulvovaginite por *Candida* sp. A mucosa da vagina pode ser invadida durante a gravidez e no diabetes, estando também presente em casos de pessoas que fazem uso prolongado de antibiótico de largo espectro. Ainda não se sabe se a presença de *C. albicans* é devido à diminuição da flora bacteriana normal do organismo, diminuição da competição por nutriente ou até pela produção de substâncias inibidoras (DAVIS et al., 1979).

Várias cepas de *Candida* sp já foram identificadas, porém o agente etiológico mais comum de vaginites micóticas é a *Candida albicans*, que ocorre em 80 a 95% dos casos (ROSA et al., 2004), estudos mais antigos relataram que a frequência de candidíase vaginal por *C. albicans* estava em torno de 50% (LACAZ, 1980). Galle e Gianinni (2004), relataram que as infecções por espécies de *C. não-albicans* nas últimas décadas tem aumentando, e esse aumento é devido ao uso inadequado de antimicóticos. Ferrazza et al. (2005), salientaram que a preocupação maior em torno do aumento da frequência de espécies de *C. não-albicans* é devido ao fato de que essas espécies possuem uma tendência a serem mais resistentes aos antifúngicos, e normalmente associadas com infecções hospitalares.

Os principais agentes causadores de afecções vaginais são as vaginites por *C. albicans* e por *Trichomonas vaginalis*, além da vaginose por *Gardnerella vaginalis* (LEVINSON et al., 1998). Nos casos de vulvovaginites por *C. albicans* pode haver presença de prurido e leucorréia que são favorecidos pelo pH elevado, diabetes ou uso de antibióticos (LEVINSON et al., 1998). A infecção por *Candida* sp prolifera em ambiente ácido de pH 3,9 a 5,0 e quando a quantidade de glicogênio está aumentada (LACAZ et al., 1980; MIMS et al., 2005). Vaginoses são caracterizadas pela substituição da biota vaginal, frequentemente ocupada por lactobacilos, por uma flora estritamente anaeróbia ou, opcionalmente, bactérias que são encontradas normalmente na vagina (ADAD et al., 2001).

TRABULSI (2005), ressalta que na candidíase oral e da mucosa vaginal, as lesões se caracterizam pelo aparecimento de placas brancas, isoladas ou confluentes, aderentes à mucosa, de aspecto membranoso, as vezes rodeado por halo eritematoso. Segundo Lacaz et al.

(1980), na fase aguda ocorrem ardor e prurido vulvar, corrimento espesso, branco, cremoso, inodoro e que pode variar na intensidade com aspecto de leite coalhado, e quando seco e presente nas vestes possui aspecto farináceo, dispaneuria e disúria surgem devido à passagem da urina na área afetada, pode apresentar também edema na vagina, discreto eritema e algumas vezes pequenas vesículas. Na fase crônica prevalece corrimento, prurido e disúria. Infecções de glândula podem aparecer no homem, balanite por *C. albicans*.

Candidíase vaginal por cepas de *C. albicans* e *C. não-albicans* não são clinicamente distinguíveis, possuem sintomas semelhantes, e em diversos casos podem ser assintomáticas. *Candida* sp pode ser isolada em até 30% das mulheres, chamadas então de *portadoras sãs* ou portadoras não sintomáticas (SIMÕES, 2005).

Apesar da frequência clínica da candidíase vaginal, os medicamentos existentes, embora eficientes quando o paciente é imunocompetente, já se mostram ineficazes em muitos casos. A medicina popular sugere diversos tratamentos, ainda não comprovados cientificamente, mas freqüentemente utilizados por mulheres que apresentam os sintomas. A maior dificuldade parece estar em associar os sintomas à doença, e na ausência de auxílio médico e diagnóstico, dificultando ainda mais o tratamento. O estudo de medicamentos mais simples, menos onerosos e eficazes permitiria uma maior adesão ao tratamento. Diante da condição e da falta de novas opções terapêuticas, o uso de terapias preventivas ou alternativas é imprescindível e entre essas está a utilização de produtos probióticos. Diversos estudos realizados *in vivo* e *in vitro* tem demonstrado que esses são capazes de modular beneficemente a microbiota vaginal.

Probióticos são considerados alimentos funcionais, que podem ser dietéticos ou suplementos alimentares com função de ativar o sistema imunológico da mucosa intestinal através do reforço de barreiras prevenindo contra a colonização por patógenos, que em alguns casos produzem substâncias nocivas ao micro-organismo invasor (CHEN et al., 2005). A FAO/WHO (Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of probiotics in Food) caracteriza os probióticos como sendo micro-organismos vivos que quando administrados em doses adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro. O termo probiótico foi utilizado pela primeira vez por LILLY et al., em 1965, e foi criado para contrastar com o termo *antibiótico* (CHEN et al., 2005).

São descritos por CHEN et al. (2005), como organismos e substâncias secretadas por eles, que contribuem para o equilíbrio microbiano das mucosas, constituem preparações que contenham organismos viáveis, em número suficiente para alterar a microflora existente, por deslocamento ou colonização, e assim exercer efeitos benéficos à saúde.

HAVENAAR et al. (1992), restringiram a classificação de probióticos a micro-organismos viáveis que promovam a saúde humana e de animais, incrementando a microbiota nativa do aparelho digestivo, trato respiratório superior, ou trato urogenital. Já SCHREZENMEIR & DE VRESE (2001), afirmaram que esses micro-organismos alteram a microbiota das mucosas por implantação ou colonização de um sistema hospedeiro. Sua capacidade de tratar doenças é descrita a milhares de anos em escrituras bíblicas, e alguns cientistas antigos os prescreviam como medicamentos para doenças metabólicas, no entanto o advento dos probióticos ocorreu no final dos anos 1800 e a partir de 1900 devido a observações científicas realizadas na época (TAMINE, 2002).

Dentre os probióticos mais utilizados, destacam-se os lactobacilos (COEURET et al., 2004). Lactobacilos são conhecidos pela produção de ácido láctico, que é importante para a produção de diversos produtos, e são considerados os primeiros hospedeiros do sistema gastro intestinal, além de serem dominantes no intestino delgado (MARCO et al., 2006). Os leites fermentados tem origem provável no Oriente Médio e nos Bálcãs, devido a grande habilidade culinária dos habitantes dessa região, essa cultura se desenvolveu muito ao longo dos séculos (TAMINE, 2002).

As principais características necessárias a um micro-organismo para ser considerado um probiótico é além de sua capacidade benéfica ao organismo ser também inócuo, manter se viável por longo tempo, tolerar baixo pH, não transportar genes transmissores de resistência a antibióticos e possuir propriedades anti-mutagênicas e anticarcinogênicas, resistir a bacteriófagos e ao oxigênio (HAVENAAR et al., 1992; MARCO et al., 2006).

A maioria dos produtos probióticos disponíveis possuem mais de 10^{10} UFC/g, e as cepas mais utilizadas são as de *Lactobacillus farciminis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus plantarum*. Estes micro-organismos são encontrados normalmente nas formas liofilizados, *spray dried* ou micro encapsulados incorporados em leites fermentados (COEURET et al., 2004; TAMINE, 2002).

Ainda não são esclarecidos os mecanismos pelos quais os probióticos atuam de forma benéfica na saúde humana, mas estudos sugerem também que favoreça reforço da barreira de mucosa, modulação da resposta imune e antagonismo de agentes patogênicos, pela produção de antimicrobianos ou através de concorrência nos sítios de ligação (MARCO et al., 2006). Alguns estudos tem demonstrado também que o uso de probióticos por mães lactantes produzem citocinas que estimulam a função imune na mucosa do bebê (CHEN et al., 2005).

Os probióticos podem auxiliar nas repostas imunológicas do tipo inespecíficas, bem como estimular o hospedeiro a produzir respostas específicas contra alérgenos que possam ser prejudiciais. Estudos recentes demonstram que o consumo de iogurte com probióticos reforçam a atividade fagocitária, a produção de citocinas, ativação de linfócito T e B e ativação de células *Natural Killer*. Esse efeito é devido à capacidade do probiótico de estimular os subconjuntos de células T-helper (Th1 e Th2), propiciando uma resposta mais eficaz e equilibrada, além de favorecer o aumento das concentrações de IFN- γ , TNF- α e IL-12, (HORI et al., 2001; CHEN et al., 2005; PERDIGÓN & ALVAREZ, 1992).

KATO et al. (1988), demonstraram que a administração de *Lactobacillus casei* favorece respostas antitumorais através da ativação de células T e de macrófagos, além de favorecer a atividade fagocitária inespecífica dos macrófagos alveolares, produzindo uma ação sistêmica através de mediadores estimuladores do sistema imune (CROSS, 2002).

Uma hipótese do mecanismo de ação dos probióticos baseia-se na interação com células dendríticas induzindo sua maturação e estimulando a produção de citocinas, o que auxiliaria na ativação de Células T helper 1 (Th1), Th2 e Th3, e essas interações são mediadas por *Lactobacillus* através de reconhecimento de receptores específicos nas Células Dendríticas SIGN (DC-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin). Somente algumas cepas de *Lactobacillus* seriam capazes de interagir com as Células Dendríticas SIGN estimulando também a produção de Interleucina 10 (IL 10) (MARCO et al., 2006).

Fica de certo modo estabelecido que os micro-organismos probióticos possuem atividades terapêuticas e que são mais utilizados na forma de leites fermentados, mais práticos de se consumir, o que culmina com uma melhora na qualidade de vida e na saúde dos seres humanos (TAMINE, 2002). A utilização de lactobacilos em cápsulas é rotineira na clínica ginecológica nos casos de Candidíase vaginal de repetição, porém relativamente onerosa. Assim, alguns clínicos tem indicado o uso da bebida Láctea tipo *Yakult*® como terapia alternativa, mas ainda não existem publicações científicas que comprovem sua eficácia. Sendo assim, a proposta deste estudo é verificar a atividade do *Lactobacillus casei* cepa *Shirota* em experimento *in vitro*, sobre a cepa de *Candida albicans* ATCC (American Type Culture Collection) 10231, contribuindo para uma maior elucidação de sua atividade benéfica.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Analisar atividade inibitória do alimento probiótico da marca *Yakult*® sobre leveduras da cepa de *Candida albicans*, ATCC (American Type Culture Collection) 10231, *in vitro*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do probiótico sobre o crescimento *in vitro* de leveduras da espécie *C. albicans* nos tempos de 24, 48 e 72 horas.
- Verificar a atividade inibitória do probiótico sobre a formação de pseudo-hifas.
- Possibilitar uma alternativa de controle das vaginites de repetição, causadas por leveduras do gênero *Candida*.

3 MATERIAL E MÉTODO

CEPA UTILIZADA: Foi utilizada cepa de *C. albicans* (ATCC 10231) mantida em ágar Sabourad-dextrose a 30°C pelo Laboratório de Biologia da Universidade do Sagrado Coração – USC, Bauru (SP). A amostra teve repique prévio à realização do experimento, assegurando células viáveis.

PROBIÓTICO: Foram utilizados os alimentos probióticos da marca *Yakult*®, tradicional e tipo 40, de acordo com a data de fabricação e dentro da data de validade. A bebida Láctea probiótica foi preparada utilizando-se 2 mL do produto, que foi colocado em tubo *Eppendorf* estéril e centrifugado a 10000 rpm por cinco minutos. Os micro-organismos isolados no sedimento foram diluídos a 1 e 5 %, em soro fisiológico estéril no momento do uso.

Parte do sedimento dos produtos lácteos tradicional e tipo 40 foram semeados em ágar sangue e incubados a 37° C por 48 horas, para verificar a viabilidade do micro-organismo probiótico.

SUSPENSÃO DE LEVEDURA: Foi preparado uma suspensão com a levedura *Candida albicans*, ATCC 10231, segundo a escala de 0,5 Mc Farland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) em soro fisiológico estéril.

EXPERIMENTO: No momento de uso, 100µL da suspensão de levedura foi adicionada a 2 ml de meio RPMI e acrescido da diluição do lactobacilo previamente preparado, como segue abaixo:

- **tubo 1** - controle positivo (2 mL meio RPMI e 100µL da suspensão de levedura);
- **tubo 2** - 2 mL meio RPMI e 100µL da suspensão de levedura, foi adicionado 200µL da diluição 1% do produto probiótico *Yakult*® Tradicional;
- **tubo 3** - 2 mL meio RPMI e 100µL da suspensão de levedura, foi adicionado 200µL da diluição 5% do produto probiótico *Yakult*® Tradicional;
- **tubo 4** - 2 ml meio RPMI e 100µL da suspensão de levedura, foi adicionado 200µL da diluição 1% do produto probiótico *Yakult*® 40;
- **tubo 5** - 2 ml meio RPMI e 100µL da suspensão de levedura, foi adicionado 200µL da diluição 5% do produto probiótico *Yakult*® 40;

Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Os tubos foram incubados em estufa a 37° C. Posteriormente submetidos à contagem do número de leveduras em câmara de *Neubauer*, após 24, 48 e 72 horas da incubação.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este estudo tem como principal objetivo tentar elucidar qual seria a atividade do *Yakult*® sobre o crescimento da levedura, ou mesmo alteração de pH local. Os resultados observados do efeito inibitório de crescimento da levedura, pelos probióticos tradicional e tipo 40, nos diferentes tempos, estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1 - Relação de número de levedura do gênero *Candida albicans*, sob atividade inibitória do probiótico *Yakult*®, tradicional e tipo 40, nos diferentes tempos.

Período (horas)	Nº leveduras				
	Controle (+)	Tradicional 1%	Tradicional 5%	Tipo40 -1%	Tipo40 -5%
24	300x10 ⁵	370x10 ⁵	402x10 ⁵	347x10 ⁵	289x10 ⁵
48	379x10 ⁵	251x10 ⁵	362x10 ⁵	291x10 ⁵	241x10 ⁵
72	389x10 ⁵	252x10 ⁵	368x10 ⁵	300x10 ⁵	324x10 ⁵

Percebe-se claramente o efeito inibitório sobre o crescimento da levedura, tanto pelo *Yakult*® Tradicional como pelo *Yakult*® 40, quando comparado ao ensaio controle. A redução do número de leveduras foi superior a 30% no tubo tratado com *Yakult*® tradicional a 1% , superior a 8% quando tratado com tradicional a 5% e superior a 13% quando tratado com o tipo 40 a 1% após 72 horas de incubação. Ao tratar a levedura com *Yakult*® tipo 40 a 5% observou-se redução de crescimento inicialmente, mas crescimento discreto da levedura em 72 horas. Podemos considerar que a interação benéfica entre o lactobacilo e a levedura é dose dependente, e que um excesso de probiótico possa não ser o ideal. Mesmo assim apenas esse dado é muito pouco para maiores conclusões.

A utilização de alimento lácteo tipo probiótico tem sido cada vez mais estimulada e discutida nos meios científicos (COPPOLA et al., 2003; LOURENS et al., 2001; MORAIS et al., 2006; COURET et al., 2004). Mesmo com a descrição de sua utilização desde as épocas antigas, somente nesses tempos seus efeitos biológicos começaram a ser questionados. Mesmo com o crescimento de estudos nessa área, existem poucos registros da aplicação *in vivo* desse tipo de produto nutracêutico.

O alimento tipo *Yakult*® foi escolhido por ser o mais antigo e mais utilizado, e o que facilita sua compra e consumo é o programa de venda domiciliar oferecido pela empresa. Esse tipo de produto tem sido utilizado como terapia alternativa de controle da candidíase vaginal

recorrente, de modo empírico, inclusive com aplicação local das várias formas existentes do produto.

De modo geral, ao se considerar todo o experimento, a inibição não é de certa forma em grande número, mas significativa. Percebeu-se também uma redução e estabilização da formação de pseudo-hifas que são características da instalação da Vaginite por *Candida*, essa redução mostra a real atividade da terapia alternativa. Como esse experimento foi realizado no tempo de apenas 72 horas, talvez *in vivo*, em um tempo maior, essa inibição possa realmente determinar uma redução na doença provocada pela levedura. A falta de bibliografia de para comparação de resultados dificulta maiores análises.

Como o probiótico *Lactobacillus casei* cepa *Shirota* não é um bacilo residente na mucosa vaginal sua aderência fica prejudicada e, portanto sua atividade se torna restrita. O questionamento seria qual o mecanismo de ação do produto sobre a levedura na mucosa. A primeira idéia seria a variação de pH, uma vez que a fermentação do produto acarretaria acidez na mucosa culminando com a diminuição da atividade da levedura, isso resultaria na melhora de sintomas clínicos. De acordo com o experimento realizado, não houve alteração significativa no pH nos períodos de 24, 48 e 72 horas, permanecendo um pH estável em torno de 9,0, como mostra a Tabela 2

Tabela 2 - Relação de variação do pH em meio contendo levedura do gênero *Candida albicans*, sob ação do probiótico *Yakult*®, tradicional e tipo 40, nos períodos de 24, 48 e 72 horas.

Período	pH				
	Controle +	Tradicional 1%	Tradicional 5%	Tipo40 1%	Tipo40 5%
24 horas	9,0	8,5	8,0	9,0	8,5
48 horas	9,0	9,0	9,0	9,0	9,0
72 horas	9,0	9,0	9,0	9,0	9,0

A pequena oscilação no pH se deve ao fato de que as bactérias probióticas são produtoras lentas de ácido (MARSHALL et al., 1997), essa característica afeta diretamente o resultado final do experimento, pois a fermentação do probiótico deixaria o pH baixo e, portanto inibiria o crescimento e proliferação do fungo que se desenvolve mais facilmente em pH de 3,9 a 5,0 (LACAZ et al., 1980; MIMS et al., 2005), mas por outro lado diversas publicações demonstraram que é baixa a sobrevivência e viabilidade de bactérias probióticas

em pH baixos (DAVE et al., 1997; GILLILAND et al., 1977; HULL et al., 1984; KAILASAPATHY et al., 1997; SCHIOPPA, et al., 1981; SHAH, 2000; SHAH et al., 1995).

O meio de cultivo RPMI é constituído basicamente de diversos antibióticos, proteínas, e açúcares, vermelho de fenol como indicador de pH e é considerado satisfatório para ensaios com fungos (NCCLS, 2005).

Mesmo não tendo modificação no pH, o fato é que houve diminuição no número de leveduras ao se comparar os grupos tratados com o grupo controle. Como o número de publicações tratando do tema é restrito, fica difícil ponderar sobre as causas dessa diminuição, mesmo assim, podemos sugerir, uma competitividade entre os micro-organismos por nutrientes ou mesmo a liberação de substância pelo probiótico que possa inibir o desenvolvimento da levedura.

A viabilidade do produto lácteo pode ser comprovada pelo crescimento de colônias em agar sangue, após 48 horas de incubação (figura 1). O crescimento do lactobacilo confirma a presença do micro-organismo no produto, mas não percebemos diferenças significativas ao se comparar os experimentos realizados com o produto tradicional e o tipo 40.

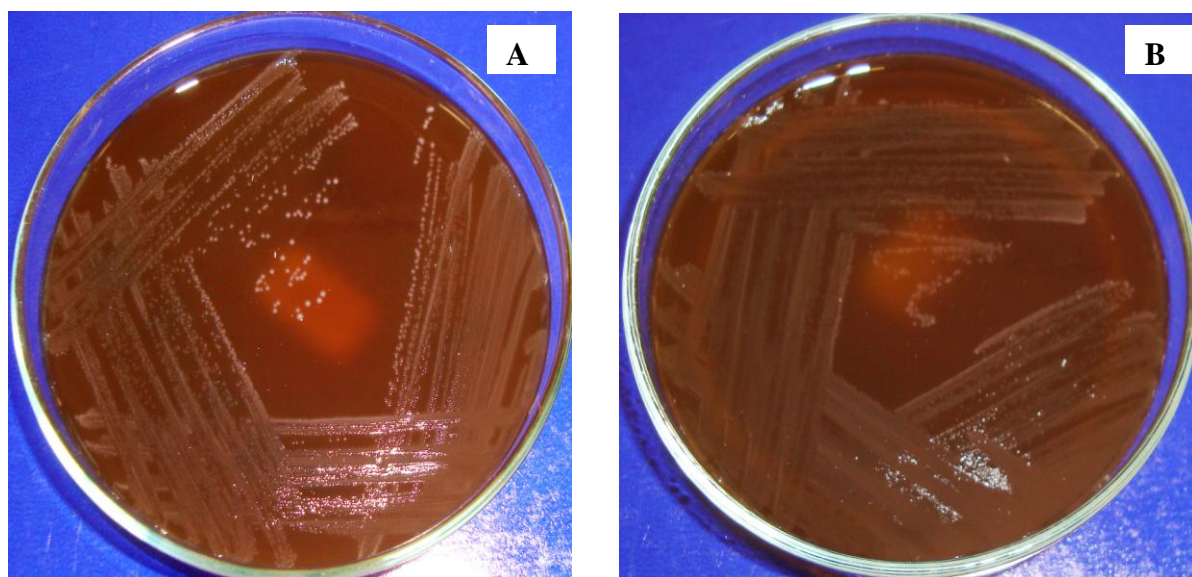


Figura 1 – Crescimento de colônias a partir de inóculo obtido do sedimento do produto lácteo *Yakult*® Tradicional (A), e do tipo 40 (B), em ágar sangue, crescimento de bactérias probióticas.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O alimento probiótico *Yakult*®, tanto a variedade tradicional como o tipo 40 apresentou atividade de inibição de crescimento sobre leveduras *Candida albicans* em experimento *in vitro*.
- A redução de crescimento de leveduras não foi em decorrência de modificação do pH do meio. Talvez o lactobacilo do alimento lácteo possa inibir o crescimento da levedura por competitividade de nutrientes ou por secretar no meio algum fator inibitório para a levedura, mas o fato é que outros testes precisam ser realizados para verificar a real causa dessa inibição.
- Observou-se discreta redução no tamanho de pseudo-hifas ao se comparar os tubos tratados com o controle. A formação de pseudo-hifas é fator de patogenicidade da levedura. O experimento, *in vitro* foi realizado num tempo de apenas 72 horas, e mesmo assim esse efeito foi observado. Fica difícil quantificar essa redução, mas talvez no uso *in vivo*, por um período prolongado e com constante reutilização do probiótico esse efeito seja mais significativo.
- Foi possível constatar viabilidade da bactéria probiótica no produto lácteo, mas em número muito pequeno, o que poderia restringir sua atividade inibitória sobre a levedura ou outro micro-organismo *in vivo*. Podemos considerar que a atividade benéfica do alimento probiótico se deva a sua utilização por período prolongado, de modo que o lactobacilo possa gradualmente colonizar a mucosa e por competitividade inibir a instalação de patógenos.

6 REFERÊNCIAS

- ADAD, S. J. **Frequency of Trichomonas vaginalis, Candida sp and Gardnerella vaginalis in cervical-vaginal smears in four different decades.** Revista Paulista de Medicina, São Paulo, 2001.
- ÁLVARES, C. A. et al. **Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras.** Jornal Brasileiro de Patologia Medicina Laboratorial. v. 43, n. 5, out. 2007.
- BOATTO, H. F. et al. **Correlação entre os resultados laboratoriais e os sinais e sintomas clínicos das pacientes com candidíase vulvovaginal e relevância dos parceiros sexuais na manutenção da infecção em São Paulo, Brasil.** São Paulo, 2006.
- CHEN, C. C., WALKER W. A. **Probiotics and prebiotics: role in clinical disease states.** Adv. Pediatr. 2005; 52:77-113.
- COPPOLA, M. de M; TURNES, C. G. **Probióticos e resposta imune.** Ciência Rural, Santa Maria, v.34, n.4, p.1297-1303, 2004.
- COURET, V. et al. **Numbers and strains of lactobacilli in some probiotic products.** International Journal of Food Microbiology, 2004.
- CROSS, M.L. **Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens.** FEMS Immunology and Medical Microbiology, Amsterdam, v.34, n.4, p.245-253, 2002.
- DAVE, R. I.; SHAH, N. P. **Viability of yogurt and probiótico bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures.** International Dairy Journal, 7, 31–41, 1997.
- DAVIS, Bernard D; et al. **Microbiologia.** São Paulo: Harper & Row do Brasil, v.1-4, 1979.20.
- FAO/WHO. **Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of probiotics in Food.** London, Ontario, Canada, april 30 and may 1, 2002.
- FERRAZZA, M. H. S. H. et al. **Caracterização de leveduras isoladas da vagina e sua associação com candidíase vulvovaginal em duas cidades do sul do Brasil.** Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia, Rio de Janeiro, v. 27, n. 2, p. 58-63, fev. 2005.
- GALLE, L. C; GIANINNI, M. J. S. M. **Prevalência e susceptibilidade de leveduras vaginais.** Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, Rio de Janeiro, v. 40, n. 4, p. 229-236, ago. 2004.
- GILLILAND, S. E.; SPECK, M. L. **Instability of Lactobacillus acidophilus in yogurt.** Journal of Dairy Science, 60, 1394–1398, 1977.
- HAVENAAR, R.; HUIS IN'T VELD, M. J.H. **Probiotics: a general view.** In: WOOD, B.J.B. Lactic acid bacteria in health and disease 1. Amsterdam: Elsevier Applied Science, 1992. p.151-170.

HORI, T. et al. **Effect of intranasal administration of *Lactobacillus casei* Shirota on Influenza virus infection of upper respiratory tract in mice.** Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, New York, v.8, n.3, p.593-597, 2001.

HULL, R. R. et al. **Survival of *Lactobacillus acidophilus* in yoghurt.** The Australian Journal of Dairy Technology, 39, 164–166, 1984.

KAILASAPATHY, K. **Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt.** University of Western Sydney, Australia.

KATO, I.; YOKOKURA, T.; MUTAI, M. **Correlation between increase in Ia-bearing macrophages and induction of T cell dependent antitumor activity by *Lactobacillus casei* in mice.** Cancer Immunology Immunotherapy, New York, v.26, n.3, p.215-221, 1988.

LACAZ, C. S. et al. **Guia para identificação: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico.** São Paulo: Sarvier, 1998. 445p.

LACAZ, C. S. (Org). **Candidíases.** São Paulo: EPU: Edusp, 1980. p. 113-120.

LANCHA, M. P. **Determinación de morfotipos de *Candida* spp en exudados vaginales.** Rev. Cubana Méd. Trop., 2003.

LEVINSON, W; JAWETZ, E. **Microbiologia Médica e Imunologia.** 4. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1998.

LILLY D. M.; STILLWELL R. H. **Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms.** Science 1965; 147: 747-748.

LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B. C. **Review: Yoghurt as probiotic carrier food.** International Dairy Journal, 11, 1–17, 2001.

MARCO, M. L. et al. **Towards understanding molecular modes of probiotic action.** Current Opinion in Biotechnology, 2006.

MARSHALL, V. M.; TAMIME, A. Y. **Starter cultures employed in the manufacture of biofermented milks.** International Dairy Journal, 50, 35–39, 1997.

MIMS, C. et al. **Microbiologia Médica.** 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

MORAIS, M. B de; JACOB, C. M. A. **O papel dos probióticos e prebióticos na prática pediátrica.** Jornal de Pediatria, Porto Alegre, v. 82, n. 5, 2006.

National Committee on Clinical Laboratory Standards (NCCLS). **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica dos Fungos Filamentosos: Norma Aprovada.** Wayne, v. 22, n. 16, 2005.

PERDIGÓN, G.; ALVAREZ, S. **Probiotics and the immune state.** In: FULLER, R. Probiotics: the scientific basis. London: Chapman e Hall, 1992. p.145-180.

ROSA M. I.; RUMEL D. **Fatores associados a candidíase vulvovaginal: estudo exploratório.** Ver. Brás. Ginecol. Obstet. 2004; 26(1):65-70.

SCHIOPPA, F. **Addition of Lactobacillus to yogurt.** Rivista della Scienza Italiano di Scienza dell Alimentazione, 10, 247–253, 1981.

SCHREZENMEIR, J.; DE VRESE, M. **Probiotics, prebiotics and symbiotics-approaching a definition.** American Journal of Clinical Nutrition. Bethesda, v.73, n.2, p.361S-364S, 2001.

SHAH, N. P. **Probiotic bacteria:** Selective enumeration and survival in dairy foods. Journal of Dairy Science, 83, 894–907, 2000.

SHAH, N. P. **Survival of Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium bifidum in commercial yoghurt during refrigerated storage.** International Dairy Journal, 5, 515–521, 1995.

SIMÕES, J. A. **Sobre o diagnóstico da candidíase vaginal.** Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia, Rio de Janeiro, v. 27, n. 5, p. 233-234, maio. 2005

TAMINE, Y. **Fermented milks:** a historical food with modern applications-a review. European Journal of Clinical Nutrition, 2002.

TRABULSI, Luiz Rachid. **Microbiologia.** São Paulo: Atheneu, 2005.