

**UNIVERSIDADE DE TAUBATÉ**  
**Gabriela Massis Claro Cunha**

**INTERFERÊNCIA DE UMA CEPA PROBIÓTICA DE**  
***Bacillus clausii* SOBRE O CRESCIMENTO DE**  
***Candida albicans***

**Taubaté – SP**  
**2018**

**Gabriela Massis Claro Cunha**

**INTERFERÊNCIA DE UMA CEPA PROBIÓTICA DE  
*Bacillus clausii* SOBRE O CRESCIMENTO DE  
*Candida albicans***

Trabalho de Graduação, apresentado ao Departamento de Odontologia da Universidade de Taubaté como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Odontologia.

Orientação: Profa. Dra. Silvana Soleo Ferreira dos Santos

**Taubaté – SP**

2018

**SIBi – Sistema Integrado de Bibliotecas / UNITAU**

C972i Cunha, Gabriela Massis Claro  
Interferência de uma cepa probiótica de *Bacillus clausii* sobre o crescimento de *Candida albicans* / Gabriela Massis Claro Cunha. -- 2018.  
28 f. : il.

Monografia (graduação) – Universidade de Taubaté, Departamento de Odontologia, 2018.

Orientação: Profa. Dra. Silvana Soléo Ferreira dos Santos,  
Departamento de Odontologia.

1. *Bacillus clausii*. 2. *Candida albicans*. 3. Probiótico. I. Universidade de Taubaté. II. Título.

CDD - 616.01

**GABRIELA MASSIS CLARO CUNHA**  
**INTERFERÊNCIA DE UMA CEPA PROBIÓTICA DE *Bacillus clausii* SOBRE O**  
**CRESCIMENTO DE *Candida albicans***

Trabalho de Graduação, apresentado ao Departamento de Odontologia da Universidade de Taubaté como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Odontologia.  
Orientação: Prof. Dra. Silvana Soleo Ferreira dos Santos

Data: \_\_\_\_\_

Resultado: \_\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

Prof. \_\_\_\_\_

Universidade de Taubaté

Assinatura

Prof. \_\_\_\_\_

Universidade de Taubaté

Assinatura

Prof. \_\_\_\_\_

Universidade de Taubaté

Assinatura

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, que me capacitou durante todo o percurso, me possibilitando chegar onde sempre sonhei.

Aos meus pais, Walter Junior e Maria Stella Massis, que sempre me incentivaram e apoiaram.

Aos meus familiares, por toda torcida, em especial ao meu avô, Walter Cunha, que me ensinou a amar a odontologia, e a minha avó, Yvone Cunha, que se alegrou comigo em cada fase que passei.

A professora Silvana Soleo Ferreira dos Santos, pela orientação e apoio.

A Universidade de Taubaté, por me disponibilizar os materiais necessários durante toda a execução desta pesquisa.

Aos meus amigos, Higor Henrique, Luana Cunha, Luiz Gustavo e, em especial, a Vitória Gomes, minha dupla clínica que muito me incentivou e apoiou. A todos, que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

*Ama e faz o que quiseres. Se calares, calarás com amor; se gritares gritará com amor; se corrigires corrigirá com amor; se perdoares perdoará com amor. Se tiveres o amor enraizado em ti, nenhuma coisa senão o amor serão os teus frutos.*

Santo Agostinho

## RESUMO

*Candida albicans* é um fungo dimórfico que faz parte da microbiota residente, mas pode causar dano mediante fatores predisponentes. Em decorrência do surgimento de cepas resistentes a vários antifúngicos, alternativas para prevenção e tratamento têm sido estudadas, dentre as quais estão os probióticos, microrganismos vivos benéficos ao hospedeiro quando administrado em dosagem ideal. *Bacillus clausii* é um probiótico comercializado na forma esporulada, sua forma de resistência, o que permite viabilidade em toda e qualquer forma de produção, armazenamento e ingestão. O objetivo do presente estudo foi avaliar se a uma cepa probiótica de *B. clausii* (Enterogermina®) seria capaz de interferir negativamente sobre o crescimento de *C. albicans*. Nos ensaios teste foi observada uma média de crescimento de 124,89 unidades formadoras de colônias (UFC) UFC de *C. albicans*/placa (desvio padrão=25,12) e nos ensaios controle, 129,11 UFC de *C. albicans*/placa (desvio padrão=33,88). Não houve diferença estatística significativa entre teste e controle ( $p=0,8946$ ). A partir da metodologia utilizada não houve interferência da cepa probiótica de *B. clausii* (Enterogermina®) sobre o crescimento de *C. albicans*.

Palavras-chave: Probiótico. *Bacillus clausii*. *Candida albicans*.

## ABSTRACT

*Candida albicans* is a dimorphic fungus that is part of the resident microbiota, but can cause damage by predisposing factors. As a result of the emergence of resistant strains to various antifungal agents, alternatives for prevention and treatment have been studied, among which are probiotics, living microorganisms that cause the host well when administered in an ideal dosage. *Bacillus clausii* is a probiotic commercialized in spore form, its form of resistance, which allows viability in any and all forms of production, storage and ingestion. The objective of the present study was to evaluate if a probiotic strain of *B. clausii*(Enterogermina®) would be able to interfere negatively on the growth of *C. albicans*. In the test assays, a mean growth of 124.89 colony forming units (CFU) CFU of *C. albicans*/plaque (standard deviation = 25.12) and in the control trials, 129.11 CFU of *C. albicans*/plaque (standard deviation = 33.88). There was no statistically significant difference between test and control ( $p = 0.8946$ ). From the methodology used, there was no interference of the probiotic strain of *B. clausii*(Enterogermina®) on the growth of *C. albicans*.

Keywords: Probiotic. *Bacillus clausii*. *Candida albicans*.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>9</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>11</b>
<b>3 PROPOSIÇÃO</b>	<b>19</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODO</b>	<b>20</b>
<b>5 RESULTADO</b>	<b>22</b>
<b>6 DISCUSSÃO</b>	<b>24</b>
<b>7 CONCLUSÃO</b>	<b>26</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>27</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Esquema da sobrecultura das placas teste e controle.....	21
Figura 2-	Média e desvio padrão para os ensaios controle (solução salina <i>C. albicans</i> ) e teste ( <i>B. clausii</i> <i>C. albicans</i> ). Teste de Mann-Whitney.....	22
Figura 3-	Número de unidades formadoras de colônias por placa nos ensaios teste e controle.....	23

## 1 INTRODUÇÃO

A candidose é uma infecção oportunista, causada por fungos do gênero *Candida*, principalmente *C. albicans*.<sup>1</sup>

Leveduras do gênero *Candida* podem estar presentes na cavidade bucal humana como microbiota suplementar e, em determinadas situações, podem causar doença.<sup>2,3</sup>

Existem vários fatores predisponentes para o desenvolvimento de candidose, incluindo doenças sistêmicas que afetam o estado imunológico do hospedeiro, alterações ambientais e a estirpe específica de *C. albicans*.<sup>4</sup>

Fatores facilitadores podem causar candidose na boca, como o uso de próteses dentais removíveis (totais e parciais)<sup>3</sup>, o hábito de fumar<sup>5</sup> e também deficiências físicas que prejudicam a higiene oral adequada ou nutrição.<sup>4</sup>

O principal método terapêutico para candidoses são os antifúngicos, tais como a Nistatina e a Anfotericina B. Ambos possuem o mesmo mecanismo de ação, interagem com o ergosterol da membrana citoplasmática dos fungos, fazendo com que sejam formados canais, ocorrendo assim um extravasamento do conteúdo celular, levando a morte da célula fúngica.<sup>6</sup>

O aumento de cepas de *C. albicans* resistentes aos antifúngicos convencionais, leva à busca por novas drogas e tratamentos alternativos, como o uso de probióticos, que são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro.<sup>7</sup>

Os probióticos ou “bactérias amigáveis”, estão se tornando cada vez mais disponíveis ao público como alimentos funcionais benéficos que pretendem promover a saúde dos consumidores. Em alguns países, os probióticos estão disponíveis para bacterioterapia oral e bacterioprolaxia de distúrbios gastrointestinais em humanos. Dentre esses estão espécies de *Bacillus* que consistem em preparações de esporos bacterianos, com a vantagem de que o esporo pode sobreviver intacto no trânsito pelo estômago.<sup>8</sup>

Diante do exposto, esse trabalho objetivou estudar a interferência de uma cepa probiótica de *Bacillus clausii* (Enterogermina®) sobre o crescimento de *Candida albicans*.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

Cavassani et al.<sup>9</sup> avaliaram a candidose oral como um marcador de prognóstico em pacientes portadores de HIV. O estudo foi realizado a partir de 431 prontuários de pacientes portadores de HIV no Serviço de estomatologia do hospital de Heliópolis, em São Paulo (Brasil). Os dados foram reunidos em um programa de computador desenvolvido pelo CDC (Center for Disease Control & Prevention), o EpiInfo 6.04/2000 que os relacionou e analisou estatisticamente através de porcentagem e análise de significância. Os pacientes com manifestações estomatológicas foram 128, com incidência, em ordem decrescente, de formas pseudomembranosas, queilite angular e eritematosa. Também foram observadas associações de formas de candidose e presença em múltiplos sítios bucais, o que pode estar relacionado a imunossupressão causada pela diminuição dos linfócitos CD4 e a fatores locais, como a xerostomia, que é comumente encontrada em pacientes portadores de HIV após a introdução de medicamentos antirretrovirais. Os pesquisadores concluíram que há relação entre a candidose pseudomembranosa como lesão associada a HIV, em faixa etária predominante dos 31 aos 40 anos, sendo que a forma de contágio predominante foi por via sexual, normalmente em homens leucodermas.

Scherma et al.<sup>10</sup> avaliaram os fatores predisponentes para candidose bucal em recém-nascidos. O estudo foi realizado com 33 recém nascidos no Hospital da Universidade de Taubaté, acompanhados mensalmente por um período de quatro meses, em que era realizada anamnese com questionário, avaliando higiene da cavidade bucal do recém-nascido, higiene das mamas, utilização e limpeza de chupeta e mamadeira, recém-nascidos que receberam beijo na boca, introdução de aleitamento artificial e outros tipos de alimentos, e condição de saúde bucal. De acordo com os autores a presença de *Candida* na cavidade bucal do recém-nascido pode estar relacionada a partos prematuros, baixo peso ao nascer, ventilação mecânica, alimentação parenteral, dedos das enfermeiras, berçário, mamadeiras e chupetas infectadas, ar, água e antibioticoterapia de amplo espectro. Consideraram que o bico da mamadeira pode irritar a cavidade bucal e levar a alteração da microbiota, favorecendo o aumento da quantidade de *Candida*, e, conseqüente

infecção. Com o estudo, os autores obtiveram dados comprovando que os fatores de risco envolvidos no desenvolvimento da candidose no grupo estudado foram o uso de chupeta e mamadeira, além da introdução de outros alimentos além do aleitamento materno.

Martins et al.<sup>11</sup> selecionaram, reuniram e revisaram literaturas a respeito da candidose, com o objetivo de reunir os dados mais importantes sobre a doença, permitindo ao acadêmico e profissional uma ampla visão sobre o assunto. Os autores definiram a candidose como uma infecção micótica comum na cavidade oral, causada por *Candida albicans* e espécies relacionadas, integrantes da microbiota comensal, podendo tornar-se patógena através de fatores locais ou sistêmicos que desfavoreçam a capacidade competitiva da microbiota, normalmente acometendo pacientes em extremos de idade, leucêmicos, portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida e HIV, tratados com radioterapia ou quimioterapia e expostos a fatores predisponentes, tais como os portadores de próteses. Apresenta-se de forma aguda como lesões com membrana branco-amarelada, amolecida, facilmente removível com raspagem, deixando eritema após sua remoção, ou crônica, atrófica, acometendo palato de pacientes com próteses mal adaptadas e/ou mal higienizadas, que favoreçam a proliferação de microrganismos, aparecendo como lesão avermelhada, aveludada, circunscrita ou difusa, ulcerada ou não. Microscopicamente as candidoses apresentam epitélio acantótico, edema em camada superficial e infiltrado inflamatório, além de fungos, células epiteliais descamadas, bactérias e fibrina na pseudomembrana. O diagnóstico é dado através de citologia esfoliativa, biópsia e através de aspectos clínicos e microbiológicos. Para o tratamento, é utilizado antifúngico tópico, tendo a Nistatina como primeira opção, além de orientação de higienização e troca das próteses e medicação sistêmica em pacientes imunossuprimidos ou com relato de infecção persistente.

Stramandinoli et al.<sup>12</sup> avaliaram a prevalência de candidose bucal em pacientes hospitalizados e seus fatores de risco. O estudo foi realizado com a participação de 160 pacientes internados em dois hospitais universitários de Curitiba (São Paulo, Brasil), avaliando clinicamente a ausência ou presença de candidose e sua correlação com os fatores predisponentes. De acordo com os autores a colonização da boca por fungos do gênero *Candida*, principalmente *Candida*

*albicans* é comum em indivíduos saudáveis, podendo acarretar danos e passar da forma saprófita para parasitária quando há algum desequilíbrio ou fator predisponente, tal como aparelhos ortodônticos e protéticos, tabagismo, mudanças de hábito de higiene e alimentar, HIV, imunossupressão, entre outros. Em ambiente hospitalar a doença é comumente encontrada, pois o hábito de higienização oral é precário, e os pacientes se encontram sob terapia medicamentosa, sendo que o diagnóstico e tratamento precoce podem levar a uma melhora na condição sistêmica do paciente. Nesse estudo observaram que a candidose está intimamente ligada a fatores de estresse durante a internação, precariedade na higiene bucal, associada à terapia medicamentosa. Cerca de 30% dos pacientes avaliados apresentaram candidose, com maiores fatores de risco relacionados à idade e ao uso de sonda nasogástrica.

Bergamo et al.<sup>13</sup> relataram após revisão da literatura que *Candida albicans* é o principal agente etiológico na candidose em usuários de próteses, sendo que espécies de *Candida não albicans* já foram isoladas. Sua patogenicidade foi associada a diversos fatores de virulência, tal como adesão a células ou dispositivos e secreção de enzimas, sendo que a sua colonização se inicia pela adesão a superfície, seguida de multiplicação e recobrimento de toda a extensão de onde se deseja colonizar, e, por fim, ocorre sua maturação. O tratamento convencional se dá pelo uso de antifúngicos associado a uma boa higiene das próteses e da cavidade bucal, e, em casos extremos, substituição da antiga prótese por uma nova. A busca por tratamentos alternativos e pertinentes tem sido necessária, visto que a resistência fúngica é uma realidade, sendo assim, verificaram que diversos autores avaliaram a viabilidade de alguns tratamentos, tal como a utilização de hipoclorito de sódio a 0,5% associada à irradiação de micro-ondas, utilização de antifúngicos convencionais com óleos essenciais nas próteses, enxaguantes bucais que possuem atividade fungicida contra *Candida albicans* foram eficazes. Os autores concluíram que a busca por novas formulações ainda se faz necessária, visto que os microrganismos têm se demonstrado resistentes quando associados a essa patologia.

Freire et al.<sup>14</sup> revisaram literaturas a respeito dos fatores associados a candidose em pacientes que utilizam próteses dentárias removíveis. O levantamento de dados foi realizado no Brasil. De acordo com os autores a candidose bucal

acomete cerca de 60 a 72% dos pacientes portadores de prótese, mais comumente na forma eritematosa, decorrente da alteração do ambiente bucal, levando a modificações salivares e estruturais, resultando em desequilíbrio. A limpeza e desinfecção diária das próteses de faz necessária para a promoção de saúde e conservação dos tecidos. Os autores concluíram que a presença de *Candida* é maior em pacientes reabilitados proteticamente, sendo que a *C. albicans* é a espécie mais frequentemente isolada, além de que a má higienização é um fator retentivo de biofilme, apresentando íntima ligação com o desenvolvimento da doença.

Sena et al.<sup>15</sup> revisaram literaturas para avaliarem o melhor tratamento para candidose oral em pacientes com câncer de cabeça e pescoço. A revisão foi realizada no Brasil, em bases de dados eletrônicos MEDLINE, LILACS e BBO. Sabendo que pacientes irradiados em região de cabeça e pescoço são mais susceptíveis a infecções oportunistas por microrganismos do gênero *Candida*, os tratamentos incluíam agentes antifúngicos tópicos e sistêmicos, sendo que os principais mencionados na literatura foram Fluconazol e Anfotericina B, Nistatina, Cetoconazol, Itraconazol e Clotrimazol, sendo que a avaliação clínica foi determinada seguindo os parâmetros de melhora, cura ou recidiva do agravo. O Fluconazol foi o medicamento mais estudado para tratamento de infecções fúngicas oportunistas, apresentando melhores resultados, mas com ocorrência de resistência de determinadas linhagens de *Candida*.

Coppola e Turnes<sup>16</sup> revisaram literaturas a respeito da relação entre probióticos e a resposta imunológica. O estudo foi realizado no Brasil, em 2004. De acordo com a literatura revisada os microrganismos mais utilizados são as bactérias ácido-lácticas, bactérias não ácido lácticas e leveduras, que atuam com um mecanismo de ação que, por mais que ainda não seja completamente conhecido, é baseado na síntese de bacteriocinas, ácidos orgânicos voláteis, peróxido de hidrogênio e competição por sítios de adesão. São utilizados em medicina por terem efeito anticarcinogênico, regular a microbiota intestinal, ser imunomodulador, entre outros, exigindo uma ingestão contínua com dosagem fixa, por volta de  $10^8$  a  $10^9$  unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) do produto. Com o presente estudo os autores puderam concluir que os probióticos atuam como promotores de crescimento e reguladores da microbiota das mucosas, além de possuírem efeito imunomodulador.

Santos et al.<sup>17</sup> revisaram literaturas a respeito de probióticos, avaliando os mais utilizados e suas respectivas funções no organismo humano. Relataram que probióticos são microrganismos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde. Foram mencionados os gêneros *Lactobacillus*, Gram-positivos, não formadores de esporos, desprovidos de flagelos, anaeróbios ou aerotolerantes, que se multiplica em temperaturas entre 35°-40°C, e *Bifidobacterium*, Gram-positivos, não formadores de esporos, desprovidos de flagelos, anaeróbios, que se reproduzem entre 37°- 41 °C, como os probióticos mais utilizados nos alimentos, pois cumprem os pré-requisitos necessários para que confirmem bem ao hospedeiro, tal como competição por nutrientes e sítios de adesão, supressão do número de células viáveis em decorrência da produção de compostos com atividades antimicrobianas, serem habitantes normais do trato gastrointestinal, estáveis, não serem patógenos, ativados e multiplicados rapidamente após sua ingestão, além de resistirem a antibióticos e altas temperaturas de processamento. Quando ingeridos diariamente, em uma dosagem de 100 gramas, os probióticos possuem a capacidade de controlar e estabilizar a microbiota, auxiliar na digestão, estimular o sistema imune, aumentar a absorção de minerais, fazer a resistência gastrointestinal contra patógenos, auxiliar no alívio dos sintomas contra a intolerância a lactose e prevenindo ou reduzindo infecções vaginais causadas por *Candida albicans*. Os autores concluíram que de fato alimentos funcionais conferem efeitos benéficos ao ser humano, resultando em um maior empenho das indústrias alimentícias na produção de produtos nesse ramo, pois tem se tornado cada vez mais populares seus benefícios.

Fierro-Montil et al.<sup>18</sup> fizeram uma revisão de literatura averiguando quais probióticos são utilizados como bacterioterapia em odontologia, tal como sua utilização para o tratamento contra cárie, doenças periodontais, halitose e candidose. O estudo foi realizado no Chile, após constatarem que o uso de probióticos poderia ser uma forma alternativa de tratamento contra enfermidades bucais, assim como já vem sendo utilizado em outras áreas da medicina, por ser um tratamento com menores efeitos colaterais. Observaram que os probióticos agem através da produção de antimicrobianos e ácidos que inibem a proliferação de patógenos, competição por sítios de adesão celular, modulação da resposta

imunológica e degradação de toxinas, sendo que as bactérias probióticas mais estudadas são do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, que já fazem parte do biofilme bucal, mesmo que em pequena quantidade, além de serem raramente implicadas em infecções humanas, mostrando uma relação simbiótica no organismo. Os probióticos podem prevenir a cárie atacando diretamente os microrganismos patogênicos, ou indiretamente, atuando na seleção do patógeno, sendo o ProBiora3®, em comprimidos mastigáveis, o produto estudado que mostrou ter a capacidade de diminuir o processo de desmineralização e não interferir nas lesões já cavidadas, necessitando utilização coadjuvante a higienização bucal com dentifrícios fluoretados. Para o tratamento de doenças periodontais, avaliaram a utilização de *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) associado à *Bifidobacterium animalis* sub. espécie *lactis* BB-12, que foram capazes de diminuir a quantidade de biofilme, afetando diretamente de modo benéfico o nível de inflamação gengival, tal como o uso de Periobalance® foi capaz de diminuir a quantidade de patógenos periodontais. Cepas de *Lactobacillus salivarius* e *Streptococcus salivarius* em forma de produtos mastigáveis e *Weissella cibaria* em forma de colutório, reduziram os níveis de compostos sulfurados voláteis dos pacientes, auxiliando no tratamento da halitose. Estudos realizados com queijos que possuíam suplementação probiótica contendo *L. rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* LC705 e *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* JS, mostraram ser capazes de reduzir a quantidade de *C. albicans* e aumentar a salivação, fatores importantes para a prevenção e tratamento da candidose.

Coelho<sup>19</sup> estudou o potencial probiótico de bactérias do gênero *Bacillus* através de testes *in vitro*, avaliando atividade antibacteriana e antifúngica, teste de sensibilidade aos antibióticos, atividade antioxidante, adesão bacteriana aos hidrocarbonetos, capacidade de auto agregação, atividade de beta galactosidade, atividade de fitase, atividade celulolítica, atividade hemolítica, teste de tolerância ácida e a sais biliares, capacidade de hidrólise a sais biliares e produção de exopolissacarídeos. O estudo foi realizado após a autora perceber que ainda existem poucas bactérias do gênero *Bacillus* disponíveis comercialmente para a utilização como probióticos, apesar do número razoável de outras espécies, tal como do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, servindo como contribuição para pesquisa nessa área, podendo resultar no desenvolvimento de novos alimentos

probióticos. De acordo com a autora as características desejáveis e importantes do probiótico são a capacidade de rápida reprodução, resistência ao tempo de produção, comercialização e ingestão e produção de substâncias com efeitos diversos, que vão desde a redução de distúrbios intestinais até capacidade anticarcinogênica. O gênero *Bacillus* compreende microrganismos Gram-positivos, em forma de bastão, formadores de esporos, aeróbios ou anaeróbios, encontrados no ar, água, solo e poeira, possuem intensa atividade metabólica por produzirem enzimas que degradam muitos substratos orgânicos, além de possuírem poucas espécies patogênicas. A espécie de *Bacillus* mais utilizadas têm sido *B. licheniformis*, *B. pumilos*, *B. clausii*, *B. coagulans*, *B. thuringiensis* e *B. cereus*, possuindo a vantagem de ter a capacidade de formar esporos o que faz com que mantenham a viabilidade em ambientes não refrigerados durante seu armazenamento, podendo ser comercializado como medicamento, que é indicado para o tratamento de disfunções intestinais, ou suplemento, utilizado para aumentar o bem-estar do indivíduo. Após os testes *in vitro*, a autora concluiu inúmeros fatores importantes a respeito das bactérias do gênero *Bacillus*, tal como o fato delas terem grande potencial na indústria de alimentos, pelo fato de algumas culturas bacterianas inibirem parcialmente microrganismos patogênicos, todas as culturas serem sensíveis aos antibióticos testados, e algumas culturas apresentaram inibição a atividade antifúngica.

Santos<sup>20</sup> avaliou a possibilidade de tratar a candidose em gestante com a utilização de probióticos. O estudo foi realizado com a finalidade de buscar uma alternativa para tratar gestantes acometidas pelo fungo, visto que a utilização das medicações convencionais pode acarretar danos durante a gestação e fase de aleitamento. A autora concluiu que os probióticos podem ser utilizados como uma via alternativa de tratamento de candidose em gestante, pois não possuem efeitos adversos e não existem relatos de terem causado anomalias ao feto, além de que o consumo diário de *Lactobacillus* auxilia na prevenção do aparecimento da *Candida*, sendo uma ótima opção não somente para gestantes, como para pacientes diabéticos não controlados, imunossuprimidos e mulheres durante o ciclo menstrual, por inibirem o crescimento do microrganismo patogênico.

Sarmiento et al.<sup>21</sup> revisaram literaturas a respeito dos benefícios na cavidade bucal após a ingestão de alimentos com adição de probiótico. Os microrganismos

mais utilizados pertencem ao gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, ambos dominantes do intestino humano, com histórico seguro de utilização. Os autores concluíram que os estudos demonstraram resultados positivos em relação a utilização de probióticos como meio de tratamento para doenças que acometem a cavidade bucal, sendo assim um meio alternativo que ainda requer maiores estudos a respeito da dosagem, forma mais adequada para sua administração, bem como o probiótico mais indicado para essa finalidade.

Arora et al<sup>22</sup> analisaram o conteúdo presente em probióticos disponíveis comercialmente, avaliando se a quantidade presente de *Bacillus clausii* era a mencionada no rótulo. Foram utilizadas 12 amostras de três probióticos diferentes, sendo quatro de quatro lotes diferentes de cada um, com validade de dois anos. Para identificar as espécies bacterianas, foi utilizado o método MALDI-TOF-MS, e para a contagem de UFC o método de Miles e Mishra, que conta uma grande quantidade de microrganismos viáveis. Após ser realizada a contagem das amostras, observaram que somente o produto 1 (Enterogermina®) possuía a população de *B. clausii* enquanto o produto 2 e 3 apresentaram crescimento de *B. subtilis*.

### 3 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar se a uma cepa probiótica de *Bacillus clausii* (Enterogermina®) é capaz de interferir negativamente sobre o crescimento de *Candida albicans*.

## 4 MATERIAIS E MÉTODO

Cepa padrão de *Candida albicans* (ATCC 18804) foi semeada em meio de cultura ágar Sabouraud dextrose (Himedia, Mumbai, Índia) e incubada por 24 horas a 37°C, em estufa bacteriológica, para sua reativação. Após a incubação foi preparada a suspensão padronizada por espectrofotometria com 10<sup>6</sup> céls/mL e feita diluição até atingir a concentração de 10<sup>4</sup> céls/mL.

Os ensaios foram realizados pela técnica de sobrecultura em placa de *Petri*, em três momentos distintos e em triplicata.

Nos ensaios teste foram semeados 100 µL da suspensão de *Bacillus clausii* (Enterogermina® - 10<sup>9</sup> céls/mL) em 20 mL de ágar Müeller-Hinton (Himedia, Mumbai, Índia), que foram incubadas por 24 horas a 37°C. Após o período de incubação, sobre o crescimento foi vertido 20 mL de ágar Sabouraud que, após geleificação, foi semeado com 10 µL da suspensão 10<sup>4</sup> céls/mL de *C. albicans* e em seguida incubados por 48 horas a 37°C.

Nos ensaios controle foram semeados 100 µL de solução salina (NaCl a 0,9%) esterilizada em 20 mL de ágar Müeller-Hinton e incubadas por 24 horas a 37°C. Após o período de incubação, foi vertido 20 mL de ágar Sabouraud que, após geleificação, foi semeado com 10 µL da suspensão 10<sup>4</sup> céls/mL de *C. albicans* e em seguida incubados por 48 horas a 37°C.

Após o crescimento por 48 horas as unidades formadoras de colônia (UFC) das placas teste e controle foram contadas e os dados analisados. Foi utilizado o teste estatístico de Mann-Whitney para amostras pareadas com dados não paramétricos (programa Bioestat 5.0).

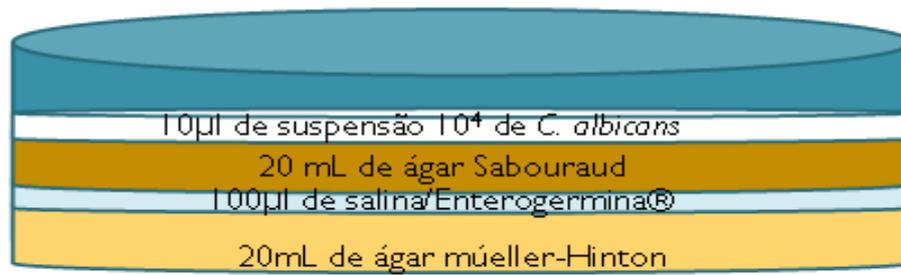


Figura 1- Esquema da sobrecultura em placas teste e controle.

## 5 RESULTADO

Nos ensaios controle (solução salina x *Candida albicans*) foi observada uma média de crescimento de 129,11 unidades formadoras de colônias (UFC) de *C. albicans* por placa (desvio padrão=33,88) e nos ensaios teste (*Bacillus clausii* x *C. albicans*), 124,89 UFC de *C. albicans*/placa (desvio padrão=25,12). Não houve diferença estatística significativa entre teste e controle (teste de Mann-Whitney,  $p=0,8946$ , Figura 1)

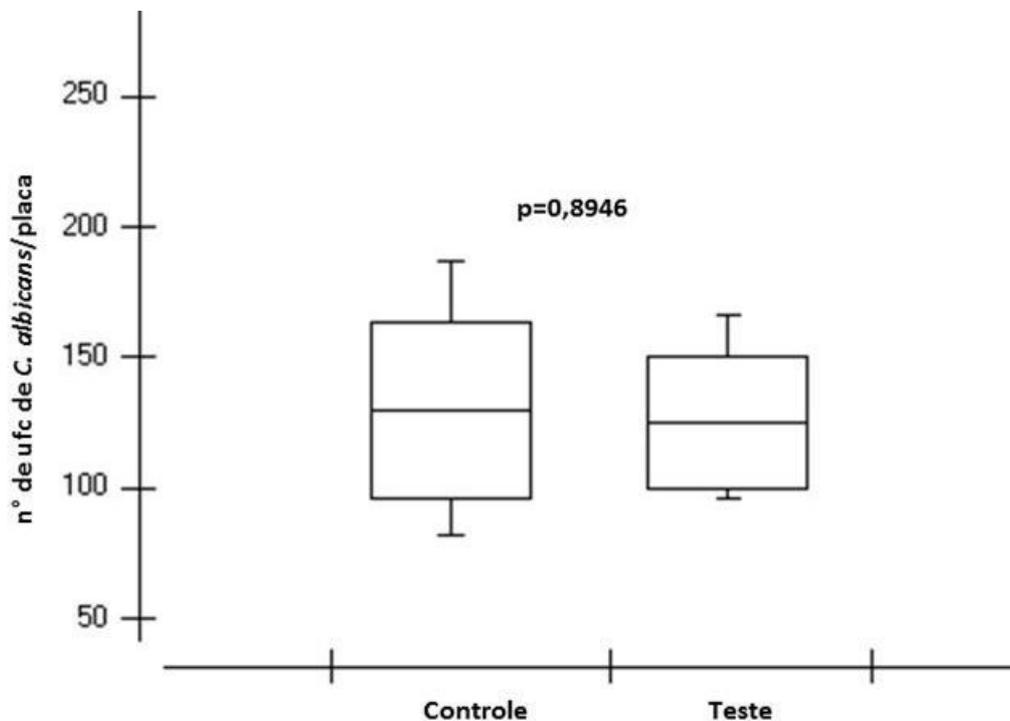


Figura 2- Média e desvio padrão para os ensaios controle (solução salina x *C. albicans*) e teste (*B. clausii* x *C. albicans*). Teste de Mann-Whitney.

A variação no número de UFC de *C. albicans*/placa dos ensaios controle e teste podem ser observados na figura 2

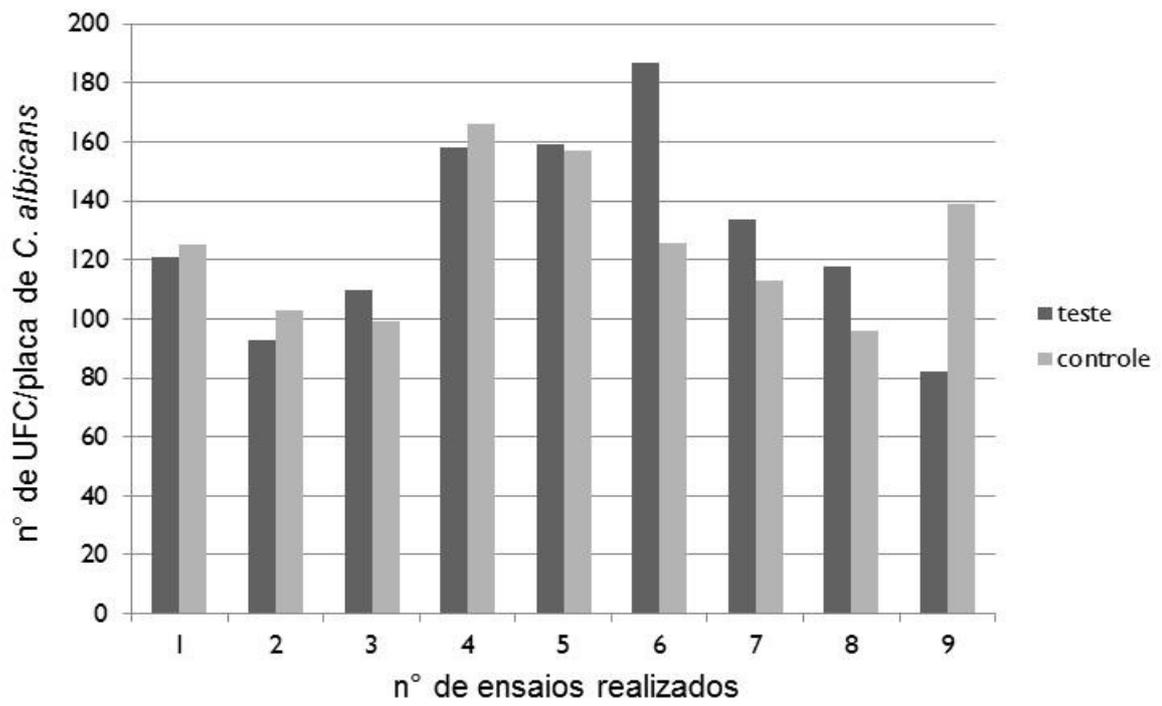


Figura 3- Número de unidades formadoras de colônias por placa nos ensaios teste e controle.

## 6 DISCUSSÃO

Probióticos têm sido estudados em odontologia como forma alternativa de tratamento (bacterioterapia) contra enfermidades bucais como cárie, doenças periodontais, halitose e candidose, assim como já vem sendo utilizado em outras áreas da medicina, por ser um tratamento com menores efeitos colaterais<sup>19</sup> e também como alternativa para inibição de espécies resistentes.<sup>24,19,20</sup>

Os gêneros probióticos mais utilizados, mencionados pela literatura, são *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*.<sup>18,19</sup> A espécie probiótica *B. clausii* foi escolhida para esse estudo devido ao fato de ser comercializada na forma esporulada (Enterogermina®), sua forma de resistência, o que permite viabilidade em toda e qualquer forma de produção, armazenamento e ingestão, além de resistência ao sulco gástrico e também por não ter sido correlacionado com patologias bucais, diferente de espécies de *Lactobacillus*, probiótico bastante consumido e estudado, que são relacionadas à progressão da cárie dentária.<sup>24</sup>

O probiótico Enterogermina® é uma suspensão de esporos de *B. clausii* utilizado na Itália há mais de 50 anos e no momento também é vendido em outros países. Foi usado com excelente tolerabilidade, sem relato de efeitos colaterais<sup>25</sup> e possui confirmação da população de *B. clausii* ( $10^9$  céls/mL), como descrito na bula.<sup>22</sup>

A liberação de substâncias antimicrobianas no meio por *B. clausii* foi observada durante a fase de crescimento estacionária e coincidiu com a esporulação. Estas substâncias são ativas contra bactérias Gram-positivas, em particular contra *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium* e *Clostridium difficile*. Na sua forma vegetativa, também demonstrou capacidade de induzir a resposta imune por meio da estimulação da síntese de óxido nítrico (NOS II sintetase), produção de INF $\gamma$  e proliferação de células T CD4.<sup>26</sup>

A candidose é uma infecção oportunista causada por fungos do gênero *Candida*, mais comumente por *C. albicans*, que podem fazer parte da microbiota residente e, mediante fatores predisponentes (imunossupressão, uso de próteses mal adaptadas e/ou mal higienizadas, utilização de chupeta, tratamento com

antibióticos de amplo espectro, radioterapia, entre outro) podem causar doença.<sup>11,12,13,14</sup> Portanto, esse estudo preliminar sobre a interferência de *B. clausii* sobre o crescimento de microrganismos envolvidos em candidoses foi iniciado com uma cepa padrão de *C. albicans*.

O resultado de presente trabalho não demonstrou uma diminuição significativa de *C. albicans* por *B. clausii* nas condições experimentais. Trabalho realizado por Leão et al.<sup>27</sup> com metodologia semelhante demonstraram redução significativa de *C. albicans* por *L. rhamnosus* depois de incubados por 24, 48 e 72 horas tanto em aerobiose quanto em microaerofilia.

Como dito anteriormente, esse é um estudo inicial, portanto, outras condições como tempo de incubação deverão ser testadas em experimentos futuros, inclusive utilizando *B. clausii* no período de passagem da forma vegetativa para a forma de esporo, pois a liberação de substâncias antimicrobianas no meio por *B. clausii* foi observada durante a fase de crescimento estacionária e coincidiu com a esporulação.<sup>26</sup>

Mais considerações a respeito do resultado desse trabalho tornam-se difíceis porque embora existam trabalhos na literatura demonstrando a interação entre bactérias probióticas e *Candida*<sup>17,18</sup>, nenhum foi encontrado até o término desse trabalho, com bactérias da espécie *B. clausii*.

Por outro lado, testes, mesmos que preliminares como o presente, tornam-se de grande importância para contribuir como parâmetro para novas pesquisas que possam mostrar se *B. clausii* é um probiótico de interesse para prevenção e/ou tratamento de candidoses.

## 6 CONCLUSÃO

A partir da metodologia utilizada não houve interferência da cepa probiótica de *Bacillus clausii* (Enterogermina®) sobre o crescimento de *Candida albicans*.

## REFERÊNCIAS

1. Jorge AOC. Microbiologia e Imunologia Oral. 1. Rio de Janeiro: Elsevier; 2012.
2. Martins CAP, Koga-Ito CY, Jorge AOC. Presence of *Staphylococcus* spp. And *Candida* spp. In the human oral cavity. Braz. J. Microbiol 2002, 33(3): 336-40.
3. Mariani TR, Silva SO, Carli JP. Prevalência de candidose bucal em pacientes hospitalizados e avaliação dos fatores de risco. Salustiva 2016, 35(3): 379-95.
4. Gianini PJ, Shetty KV. Diagnosis and Management of oral Candidiasis. Otolaryngologic Clinics of North America, Philadelphia 2011, 44(1): 231-40.
5. Lazerde LJ, Avilán BI. Candidíase eritematosa de la cavidad bucal. Report de um caso y revisión de La literatura. Acta odontológica Venezolana 2003, 41(3): 236-39.
6. Sena MF, Gondim LAM, Souza GCA, Ferreira MAF, Lima KC. Tratamento de candidíase oral em pacientes com câncer de cabeça e pescoço: uma revisão sistemática. Ver. AMRIGS 2009, 53(3): 241-45.
7. Raizel R, Santini E, Kopper AM, Filho ADR. Efeitos do consumo de probióticos, prebióticos e simbióticos para o organismo humano. Ver. Ciência & Saúde 2011, 4(2): 66-74.
8. Hoa TN et al. Characterization of *Bacillus* Species used for oral bacteriotherapy and bacterioprophyllaxis of gastrointestinal disorders. Applied and environmental micro. 2000, 66(12): 5241-47.
9. Cavassani VGS, Andrade SJ, Graça M, Homem N, Rapoport A. Candidíase oral como marcador de prognóstico em pacientes portadores de HIV. Ver. Brás Otorrinolaringol. 2002, 68(5): 630-4.
10. Sherma AP, Santos DVO, Jorge AOC, Rocha RF. Avaliação de fatores predisponentes à candidose em recém-nascidos. Cienc. Odontol. Bras. 2004, 7(1): 52-7.
11. Martins NM, Danese CC, Unfer DT. Candidíase bucal: revisão de literatura. Ver. Saúde. 2005, 31(1-2): 16-26.
12. Stramandinoli RT, Souza PHC, Westphalen FH, Bisinelli JC, Ignácio AS, Yurgel LS. Prevalência de candidose em pacientes hospitalizados e avaliação dos fatores de risco. 2010, 7(1): 66-72.13: Bergamo VZ, Lana DFD, Pippi B, Guerreiro ICK, Fuentefria AM. Novas tendências de combate ao biofilme de *Candida* em próteses dentárias. Clin Biomed Res. 2018, 38(2):155-166.
13. Bergamo VZ, Lana DFD, Guerreiro BPICK, Fuentefria AM. Novas tendências de combate ao biofilme de *Candida* em próteses dentárias. Clin Biomed Res. 2018, 38(2):155-66.

14. Freire UCP, Nóbrega MTC, Freire SCP, Dias-Ribeiro E. Candidíase oral em usuários de próteses dentárias removíveis: fatores associados. Arch Health Invest. 2017, 6(4): 159-161.
15. Sena MF, Gondim LAM, Souza GCA, Ferreira MAF, Lima KC. Tratamento de candidíase oral em pacientes com câncer de cabeça e pescoço: uma revisão sistemática. Revista da AMRIGS. 2009, 53(3): 241-245.
16. Coppola MN, Turnês CG. Probióticos e resposta imune. Ciência Rural. 2004, 34(4): 1297-1303.
17. Santos RB, Barbosa LPJL, Barbosa FHF. Probióticos: microrganismos funcionais. Ciência equatorial. 2011, 1(2): 27-37.
18. Fierro-Monti C, Aguayo-Saldías C, Lillo-Climent F, Riveros-Figueroa F. Rol de los Probióticos como bacterioterapia en Odontología. Revisión de la literatura. Odontoestomatología. 2017, 19(30): 4-12.
19. Coelho JG. Potencial probiótico de bactérias do gênero *Bacillus*. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2013.
20. Santos AS. Tratamento de candidíase em gestantes em gestantes com uso de probióticos. Ariquemes: Faema; 2015.
21. Sarmiento EG et al. Probióticos adicionados em alimentos e seus benefícios à saúde bucal: uma revisão. Ciência e Tecnologia no Campus Rio Pomba do IF Sudeste MG: Importância para o Arranjo Produtivo Local. 2018, 1(1): 6-23.
22. Arora R, Sharma P, Yadav P. Content Analysis of Commercially Available Probiotics. Rev. Indian Pediatrics. 2017, 15: 344-45.
23. Rodrigues CF, Rodrigues ME, Henriques MCR. Promising alternative therapeutics for oral candidiasis. Curr Med Chem. 2018 May 31. doi: 10.2174/0929867325666180601102333).
24. Caufield PW, Schön CN, Saraithong P, Li Y, Argimón S. Oral Lactobacilli and Dental Caries: A Model for Niche Adaptation in Humans. J Dent Res. 2015 Sep, 94(9 Suppl):110S-8S. doi: 10.1177/0022034515576052. Epub 2015 Mar 10.
25. Senesi S, Celandroni F, Tavanti A, Ghelardi E. Molecular characterization and identification of *Bacillus clausii* Strains marketed for use in oral bacteriotherapy. Appl Environ Microbiol. 2001 Feb, 67(2):834-9.
26. Urdaci MC, Bressollier P, Pinchuk I. 2004. *Bacillus clausii* probiotic strains: antimicrobial and immunomodulatory activities. J Clin Gastroenterol 38: S86–S90.
27. Mariella Vieira Pereira Leão, Célia Regina Gonçalves e Silva, Silvana Soléo Ferreira dos Santos, Poliana Gasparin Correa Leite. *Lactobacillus rhamnosus* pode alterar a virulência de *Candida albicans*. Rev Bras Ginecol Obstet. 2015, 37(9):417-20.

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

Gabriela Massis Claro Cunha

Taubaté, novembro de 2018.