

Atividade antifúngica dos lactobacillus presentes no iogurte sobre a candida albicans in vitro

Antifungal activity of lactobacillus present in the yogurt on candida albicans in vitro

Gabriel Lopes Vasconcelos¹, Leandro dos Santos Lourenço¹, Rodrigo Marques da Silva¹, Fernando Vianna Cabral Pucci²

Como citar:

Vasconcelos GL, Lourenço LS, Silva RM, Pucci FVC. Atividade antifúngica dos Lactobacillus presentes no iogurte sobre a Candida albicans in vitro. REVISA. 2019; 8(3): 322-8. Doi: <https://doi.org/10.36239/revisa.v8.n3.p322a328>

REVISA

1. Faculdade de Ciências e Educação Sena Aires. Valparaíso de Goiás.

2. Universidade Católica de Brasília. Brasília, Distrito Federal, Brasil.

Recebido: 10/04/2019
Aprovado: 10/06/2019

RESUMO

Objetivo: Este artigo tem como objetivo avaliar a atividade antifúngica in vitro dos Lactobacillus bulgaricus e Streptococcus thermophilus que estão presentes no iogurte sobre o crescimento da Candida albicans. **Método:** Foi realizado o repique da Candida albicans, fornecido em um tubo, na placa de petri contendo o ágar sabouraud dextrose para formação de colônias e aumento da população de Candida albicans. As amostras foram diluídas em soro fisiológico e semeada na placa de petri e incubou-se por duas horas. Após as duas horas, realizou-se a semeadura do iogurte, contendo os Lactobacillus bulgaricus e Streptococcus thermophilus, sobre a placa de petri contendo a Candida albicans e incubou-se na estufa a 37° C por 48 horas. **Resultado:** Após o período de incubação, verificamos que houve a inibição do crescimento da Candida albicans, reduzindo a quantidade de colônias das placas onde foi semeado o iogurte. **Conclusão:** Os Lactobacillus presentes no iogurte foram eficazes na atividade antifúngica contra a Candida albicans in vitro. Atualmente, poucos estudos foram realizados in vitro, sendo necessário realizar novos experimentos isolando os Lactobacillus bulgaricus e Streptococcus thermophilus presentes no iogurte, para maior certeza da eficácia da atividade antifúngica de cada Lactobacillus.

Descritores: Candida albicans; Lactobacillus bulgaricus; Streptococcus thermophilus; Iogurte.

ABSTRACT

Objective: this paper aims to assess the antifungal activity in vitro of Lactobacillus bulgaricus and Streptococcus thermophilus that exist in yogurts on the Candida albicans growing. **Method:** we ringed the Candida albicans, that was provided in a tube and in a Petri's plate, containing agar Sabouraud dextrose to compose the colonies and increase the Candida albicans population. Samples were diluted in physiological solution and seeded in the Petri's plate, being incubated for two hours. After this time, we put the yogurt- containing the Lactobacillus bulgaricus and the Streptococcus thermophilus on the Petri's plate. It was incubated in the heating chamber under 37°C for 48 hours. **Results:** After the incubation period, we verified that Candida albicans growing was inhibited, reducing the number of colonies in plates where the yogurt was seeded in. **Conclusion:** the Lactobacillus existent in the yogurt has an effective antifungal activity in vitro. Nowadays, few investigations were conducted in vitro, being necessary another studies to ensure the antifungal activity effectiveness of Lactobacillus present in yogurts.

Descriptors: Candida albicans; Lactobacillus bulgaricus; Streptococcus thermophilus; Yogurt.

ORIGINAL

Introdução

Atualmente, as infecções causadas por fungos constituem um importante e ascendente problema de saúde pública devido ao número de pacientes imunocomprometidos e à incidência que tem aumentado gradualmente nas últimas décadas. Conseqüentemente, a morbidade e mortalidade provocadas por estas patologias têm apresentado taxas elevadas nos últimos anos¹⁻², sendo que a levedura da *Candida albicans* já é a segunda mais frequentemente isolada no Brasil³ e a mais frequente isolada em humanos.¹

A *Candida albicans* é uma levedura patogênica ao homem, observada pela primeira vez em 1839 pelo cirurgião alemão Bernhard Rudolf Konrad von Langenbeck, sendo considerada erroneamente a causadora do tifo uma vez que foi observada em aftas bucais de um paciente que possuía a doença. Em 1842, esse microrganismo foi classificado pelo médico David Gruby no gênero *Sporotrichum* e definiu a candidíase oral. Esse microrganismo foi estudado detalhadamente por Berg em 1846, estabelecendo definitivamente a sua relação com a candidíase oral. Anos mais tarde, em 1853, esse microrganismo foi denominado por Chales Robin de *Oidium albicans* e redenominado por Zopf de *Monilia Albicans* em 1890. E somente em 1923 essa espécie foi transferida para o gênero *Candida* e, posteriormente, foi criada a espécie *Candida albicans* por Berkhout. Ao longo da história, foram atribuídas a esta levedura mais de 111 denominações.^{1,4}

O gênero da *Candida* é o principal grupo de leveduras que causam infecções oportunistas⁵. Este gênero é composto por certa de 150 a 200 espécies^{1,5-8}, que normalmente vivem em nichos corporais, como orofaringe, cavidade bucal, trato gastrointestinal, sistema urogenital, mucosa do trato respiratório, dobras da pele, secreções brônquicas e vagina⁵⁻⁶. Do total de infecções oportunistas, 90% são causadas pelas espécies *Candida albicans* (que corresponde a 50% do valor total, sendo a espécie mais prevalente), *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*.²

A *Candida* spp. é classificada taxonomicamente no reino Fungi, divisão *Eumycota*, subdivisão *Deuteromycotina*, classe *Blastomycetes*, família *Cryptococcaceae*.¹ Ela é um fungo dimórfico, que tem a capacidade de se apresentar em diferentes morfologias, nas formas leveduriforme (associado à colonização assintomática), pseudo-hifa ou hifa verdadeira (associada aos processos patogênicos).^{2, 6, 9}

As leveduras da *Candida albicans* se tornam patogênicas em pacientes com imunodeficiência. Nessas circunstâncias, elas podem causar doença em vários órgãos e tecidos, causando infecção superficial e sistêmica^{1-2, 5}. Existem várias causas que podem levar ao desenvolvimento, tais como fármacos imunossupressores, tempo prolongado de permanência no hospital, hemodiálise, insuficiência renal, diabetes, antibióticos de largo espectro, cancro, quimioterapia, bem como cirurgias e transplantes de órgãos ou medula óssea.²

A *Candida albicans* possui basicamente três tipos de manifestações: muco cutânea, cutânea e sistêmica. A candidíase muco cutânea acomete a cavidade oral e o canal vaginal, sendo que esta é a forma mais comum nos seres humanos. A candidíase cutânea pode acometer as áreas úmidas do corpo, como os espaços interdigitais, regiões das mamas, debaixo das unhas, pregas das virilhas e axilas, consistem em manifestações superficiais^{5,7}. A infecção

sistêmica ou invasiva, conhecida como candidemia, são infecções profundas que acometem a corrente sanguínea ou órgãos que se disseminam na corrente sanguínea¹, sendo que a mortalidade, apesar dos tratamentos disponíveis, atualmente é elevada ocorrendo em 15 a 25% no caso de adultos e cerca de 10 a 15% em crianças.²

A candidíase vulvovaginal (CVV) é uma doença caracterizada pela infecção da vulva e da vagina, causada por leveduriformes do gênero *Candida*, que medem aproximadamente de 2 a 6µm^{4,7-8}. A *Candida* ssp. também pode compor a flora normal da vagina e do trato gastrointestinal, onde, em condições normais do sistema imunológico, não causa nenhum mal, somente quando começa a se proliferar excessivamente causando a candidíase^{6,8}. A candidíase vulvovaginal acomete, pelo menos uma vez na vida, cerca de 75% das mulheres, tendo diferentes fatores de risco para o desenvolvimento desta forma de doença como: utilização de hormônios, tratamento com antibióticos, uso de contraceptivos locais e diabetes.^{2,10}

A candidíase oral é a infecção oportunista mais comum nesta cavidade, a qual pode se apresentar de formas diferentes, como candidíase aguda pseudomembranosa, candidíase atrófica crônica, queilite angular, leucoplasia e candidíase muco cutânea crônica.²

O tratamento terapêutico efetivo para o tratamento da *Candida* é composto por quatro grupos de drogas que são os poliênicos, triazólicos, equinocandinas e fluocitosina.⁷ O tratamento da *Candida* oral e vaginal, que visa melhorar a sintomatologia, é realizado através de medicamentos antifúngicos^{7-8,11}, incluindo aqueles para tratamento da candidíase oral e vulvovaginal, tais como: nistatina, clotrimazol, anfotericina, fluconazol, cetoconazol, butoconazol, clotrimazol, miconazol, nistatina, tioconazol, entre outros.⁷

Para os casos sistêmicos graves, como a meningite, o tratamento consiste na prescrição de Anfotericina-B. Ela é prescrita pelo médico e administrada em nível hospitalar, pois exige uso da via intravenosa e possui altos níveis de nefrotoxicidade⁷. Nesse sentido, novos estudos apontam o medicamento Ambisome (Anfotericina B lipossomal), que contém o mesmo princípio ativo, possui uma composição especial que causa reações adversas menos graves e com menor frequência. Todavia, o uso indiscriminado dos medicamentos com doses inadequadas e o crescente uso desses medicamentos na profilaxia de infecções fúngicas têm aumentado a resistência clínica da *Candida albicans* aos antifúngicos.⁴

Uma vez que, os probióticos apresentam vários efeitos benéficos no equilíbrio da flora intestinal, fortalecendo o sistema imunológico, sendo que os mesmos são coadjuvantes no tratamento da candidíase vaginal e de repetição¹². Visto que, inicialmente foi definido como compostos ou extratos de tecidos capazes de estimular o crescimento microbiano. Em 1974, Parker definiu probiótico como relativo a organismos e substâncias que contribuíam para o equilíbrio microbiano intestinal, porém, “substância poderia incluir suplementos tais como antibióticos, que tem uma função oposta, por este motivo, abandonaram essa definição. Por volta da década de 90, uma definição mais específica foi apresentada, na qual definia os probióticos como microrganismos viáveis, o que inclui bactérias lácticas e leveduras na forma de células liofilizadas ou de produto fermentado que trazem um efeito benéfico sobre a saúde do hospedeiro após a ingestão, devido as melhorias das

propriedades da microflora nativa.¹³

Além disso, conforme a resolução RDC nº 2, de 7 de janeiro de 2002, probióticos são microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos a saúde do indivíduo. Dessa forma, o iogurte é um alimento funcional por ser uma fonte de cálcio, mas pesquisas recentes têm estudado os efeitos probióticos presentes nos produtos lácteos fermentados¹⁴, produzido por coagulação e acidificação do pH do leite, ou leite reconstituído, podendo ser adicionado, ou não, de outros produtos lácteos, através da fermentação láctea mediante o mecanismo de ação protossimbióticos do *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*.¹⁵

Devido a essas definições e a necessidade de desenvolvimento de tratamentos alternativos e/ou complementares que reduzam a taxa de resistência da *Candida albicans* às drogas disponíveis no mercado, o objetivo desse estudo foi avaliar a atividade antifúngica *in vitro* dos *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* presentes no iogurte sobre a *Candida albicans*.

Método

Trata-se de um estudo experimental, realizado no laboratório de uma faculdade privada do estado de Goiás no período de 27 de abril de 2019 a 02 de maio de 2019.

Para realização do experimento foi utilizado uma cepa de *Candida albicans* e uma amostra de iogurte natural, contendo *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, sem açúcar e conservantes da marca Nestlé®, Lote 9097132322, data de fabricação 07.04.2019 22:26, data de validade 22.05.2019.

O experimento foi realizado utilizando o meio de cultura ágar *sabouraud* dextrose - um meio para isolamento de leveduras e fungos, preparado de acordo com o método de formulação da Farmacopeia Europeia e da Farmacopeia U.S (Teste microbiano de produtos não estéreis: Teste para microrganismos específicos).

Após a obtenção da amostra, foi necessário realizar o repique da *Candida albicans*, fornecido em um tubo, na placa de petri contendo o ágar *sabouraud* dextrose para formação de colônias e aumento da população de *Candida albicans*. Para realizar o repique, utilizou-se uma alça de platina para seleção da *Candida albicans* e semeou-se na placa utilizando a técnica de semeadura de esgotamento em estrias múltiplas. Incubou-se a placa de petri em estufa a 37 °C e aguardou-se 36 horas para crescimento da *Candida albicans*.

Para realizar a inoculação da amostra, foi utilizada a escala de Mc Farland. Essa é uma escala nefelométrica usada com um padrão de turvação, mais frequentemente utilizado nos laboratórios de microbiologia, para determinar a intensidade da multiplicação em meios de cultivo. Esta multiplicação se manifesta nos meios por um aumento das partículas (fungos) que se opõem a livre passagem da luz, provocando turvação ou opacidade no meio. Assim, quanto maior o número de fungos, maior será a opacidade do meio de cultura.¹⁶

Após o crescimento da *Candida albicans* na placa de petri, utilizando a escala de Mc Farland, foi selecionada uma colônia de *Candida albicans* com uma

alça de platina e diluímos em cerca de 10 ml de soro fisiológico. Utilizando um *swab*, semeou-se a amostra da *Candida albicans*, diluída em soro fisiológico anteriormente, em uma nova placa de petri contendo o Ágar Sabouraud Dextrose. A técnica utilizada foi a semeadura por varredura. Após isso, a *Candida* semeada foi incubada na estufa a 37° C por duas horas para realizar a secagem do diluente da *Candida albicans*. Após realizar a secagem da *Candida albicans*, retirou-se a placa de petri da estufa. Realizou-se, então a semeadura, pela mesma técnica, do iogurte sobre a placa de petri contendo a *Candida albicans*. Por fim, incubou-se o composto na estufa a 37° C por 48 horas.

Resultados

Na Figura 1(a,b e c), observam-se respectivamente os resultados da análise das placas de petri contendo *Candida albicans* e iogurte; das Placas de petri contendo apenas *Candida albicans* (amostra controle); e da comparação das placas contendo apenas a *Candida albicans* com as placas onde foi semeada a *Candida albicans* e o iogurte.



Figura 1a: Placas de petri contendo *Candida albicans* e iogurte.

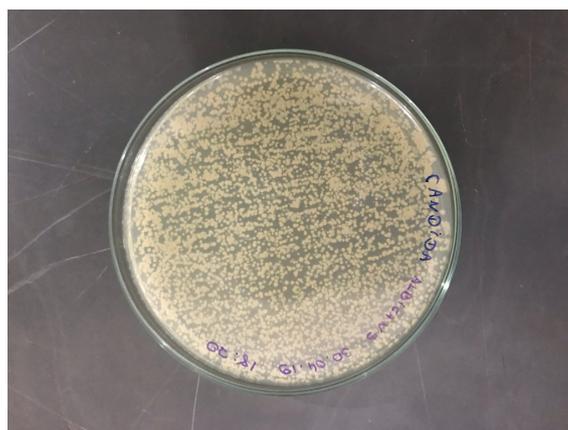


Figura 1b: Placa de petri contendo apenas *Candida albicans* (amostra controle).

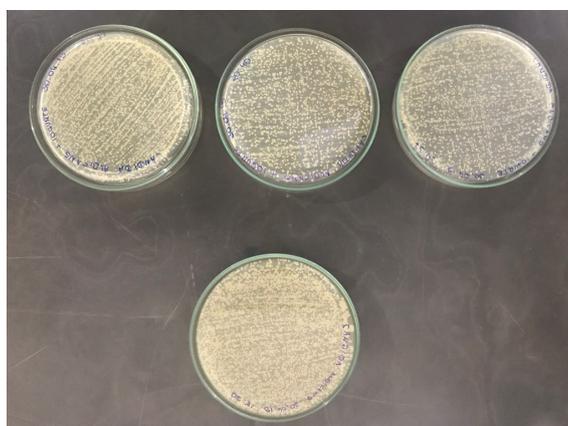


Figura 1c: Comparação das placas contendo apenas a *Candida albicans* com as placas onde foi semeada a *Candida albicans* e o iogurte.

Após o período de 48 horas na estufa, comparando com a amostra controle (somente *Candida albicans* semeada) (Figura 1b), verifica-se que houve a inibição do crescimento da *Candida albicans* (Figura 1c), reduzindo a quantidade de colônias das placas onde foi semeado o iogurte (Figura 1a).

Discussão

Algumas experiências realizadas *in vitro* mostram que algumas cepas de *Lactobacillus* podem inibir o crescimento da *Candida albicans*, porém o resultado dessas experiências não se aplicam necessariamente aos seres humanos, pois os mecanismos fisiológicos e patofisiológicos dos *Lactobacillus* e da *Candida albicans* em seres humanos são muito complexos e não podem ser imitados com exatidão no laboratório.¹⁷ Atualmente, há vários estudos que comprovam a atividade antifúngica *in vivo*, porém esses resultados não são aplicados necessariamente ao objeto de pesquisa deste artigo *in vitro*. A ingestão diária de iogurte contendo o *Lactobacillus acidophilus* reduziu, tanto a colonização, quanto a infecção por *Candida*, porém o mecanismo de ação do *Lactobacillus* pode ser multifatorial¹⁸. Outro estudo concluiu que o consumo de iogurte associado ao mel de abelha em pacientes com candidíase vulvovaginal durante a gravidez levou a um nível relativamente alto de cura clínica. Essa cura foi ainda maior que aquela produzida com o uso de terapia antifúngica, podendo ser o iogurte associado ao mel de abelha utilizada como uma terapia complementar ou alternativa quando agentes antifúngicos forem ineficazes ou contraindicados.¹⁹

Além disso, alguns estudos realizados comprovaram a eficácia dos probióticos *in vitro* sobre alguns patógenos. Em pesquisa realizada com alguns probióticos verificou-se que a maioria dos probióticos isolados nos experimentos demonstraram efeito antifúngico contra a *Candida albicans*, *in vitro*, isolados da cavidade oral, trato gastrointestinal e do trato genitourinário de humanos.²⁰

Todavia, nos estudos encontrados, somente um dos *Lactobacillus* investigados neste artigo foi avaliado, qual seja: *Streptococcus thermophilus*. Nesse estudo, realizado com o *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* presentes no iogurte, realizado no laboratório de uma faculdade privada do estado de Goiás/Brasil, foi identificado que os *Lactobacillus* apresentaram efeito antifúngico, *in vitro*, contra a *Candida albicans*.

De acordo com a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), os microrganismos *Streptococcus salivarius* (subespécie *thermophilus*) e *Lactobacillus delbrueckii* (subespécie *bulgaricus*) foram retirados da lista de probióticos reconhecidas pelo órgão. Isso ocorreu porque, além de serem espécies necessárias para produção do iogurte, de acordo com a ANVISA, os mesmos não possuem efeitos probióticos cientificamente comprovados.¹³

Conclusão

Os *Lactobacillus* presentes no iogurte foram eficazes na atividade antifúngica contra a *Candida albicans* *in vitro*. Atualmente, poucos estudos foram realizados *in vitro*, sendo necessário realizar novos experimentos isolando os *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* presentes no iogurte, para maior certeza da eficácia da atividade antifúngica de cada *Lactobacillus*.

Referências

1. Giolo MP, Svidzinski TIE. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. J. Bras. Patol. Med. Lab. 2010;46(3):225-234.
2. Cardoso TS. Papel do ATP na infecção de Macrófagos por *Candida albicans* [Dissertação]. Coimbra: Faculdade de Ciências e Tecnologia Universidade de Coimbra, Coimbra). 2013
3. Nunes EB, Nunes NB, Monteiro JCMS, Paes ALV. Perfil de sensibilidade do gênero *Candida* a antifúngicos em um hospital de referência da Região Norte do Brasil. Rev Pan-Amaz Saúde. 2011; 2(4): 23-30.
4. Tozzo AB, Grazziotin NA. Candidíase Vulvovaginal. PERSPECTIVA Erechim. 2012;36(133):53-62.
5. Vieira AJH, Santos JI. Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina. Rev. Bras. An. Clin. 2017;49(3): 235-239.
6. Álvares CA, Svidzinski TIE, Consolaro MEL. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. J. Bras. Patol. Med. Lab. 2007;43(5): 319-327.
7. Peixoto JV, Rocha MG, Nascimento RTL, Moreira VV, Kashiwabara TGB. Uma revisão de literatura. Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research – BJSCR. 2014;8(2):75-82
8. Freitas B, Pires DVDC. Fatores de Risco Associados à Candidíase Vulvovaginal. Rev. Saúde em Foco. 2016; 8(1): 247-252.
9. Richardson JP, Moyes DL. Adaptive immune responses to *Candida albicans* infection. Virulence. 2015; 6(4): 327-37.
10. Tsui C, Kong EF, Rizk MNJ. Patogênese do biofilme de *Candida albicans*, patógenos e doenças. *Pathogens and Disease*. 2016; 74(4):55-73.
11. Manguiera DFB, Manguiera LFB, Diniz MFFM. Candidose oral. Rev. Bras. de Ciências da Saúde. 2010; 14(8): 69-72.
12. Paludo RM, Marin D. Relação entre candidíase de repetição, disbiose intestinal e suplementação com probióticos: uma revisão. Rev. Destaques Acadêmicos. 2018;10(3): 46-57.
13. Nogueira JCR, Gonçalves MCR. Probióticos – Revisão da Literatura. Rev. Bras. de Ciências da Saúde. 2011;15(4): 487-492.
14. Capitani C, Hauschild FAD, Friedrich CJ, Lehn DN, Souza CFV. Caracterização de iogurtes elaborados com probióticos e fibra solúvel. Rev. Bras. de Tecnologia Agroindustrial. 2014;8(2): 1285-1300.
15. Ramos TM, Gajo AA, Pinto SM, Abreu LR, Pinheiro AC. Perfil de textura de *labneh* (iogurte grego). Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes. 2009;369(64): 8-12.
16. Scalia RA, Dolci JEL, Ueda SMY, Sassagawa SM. Atividade antimicrobiana in vitro da *Luffa operculata*. Braz. j. otorhinolaryngol. 2015;81(4): 422-430.
17. Falagas ME, Betsi GI, Athanasiou S. Probiotics for prevention of recurrent vulvovaginal candidiasis: a review. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2006;58(2): 266-272.
18. Hilton E, Isenberg HD, Alperstein P, França K, Borenstein MT. Ingestion of Yogurt Containing *Lactobacillus acidophilus* as Prophylaxis for Candidal Vaginitis. Ann Intern Med. 1992; 116(5): 353-357.
19. Abdelmonem AM, Rasheed SM, Mohamed AS. Bee-honey and yogurt: a novel mixture for treating patients with vulvovaginal candidiasis during pregnancy. Arch Gynecol Obstet. 2012; 286(1): 109-114.
20. Matsubara VH, Bandara HMIHN, Mayer MPA, Samaranyake LP. Probiotics as Antifungals in Mucosal Candidiasis. *Clinical Infectious Diseases*. 2016; 62(9): 1143-1153.

Autor correspondente:

Rodrigo Marques da Silva
Faculdade de Ciências e Educação Sena Aires.
Rua Acre, Quadra 02. Lotes 17/18, s/n - Setor de Chácras
Anhanguera. Valparaíso de Goiás, Goiás, Brasil.
marques-sm@hotmail.com