



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Autorizada pelo Decreto Federal nº 77.496 de 27/04/76
Recredenciamento pelo Decreto nº 17.228 de 25/11/2016



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENAÇÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

XXIV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - 2020

Ensaio *in vitro* de ação inibitória das culturas de bactérias lácticas sobre linhagens de *Candida* ssp. causadoras da candidíase

Bruno Pinto da Silva¹; Elinalva Maciel Paulo²

1. Bolsista FAPESB, Graduando em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: brunoslv403@gmail.com
2. Orientador, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: elinalvamaciell@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: Candidíase, bactérias lácticas, antagonismo

INTRODUÇÃO

A *Candida albicans* é um fungo dimórfico que é conhecido pela sua forma leveduriforme no estado saprofítico, ou seja, que obtém seus nutrientes a partir da matéria orgânica, e que está associado com a colonização assintomática; ou em formas filamentosas observadas em situações de processos patológicos sob algumas condições de crescimento subótimas, nesse fungo pode acontecer formação de clamidósporos (esporos arredondados que possuem uma espessa parede celular) (BAREDO, SGARBI, 2010).

O tratamento convencional se dá com o uso de antifúngicos poliênicos, com anfotericina B e fármacos das classes dos azóis e baseiam-se no uso oral ou tópicos, e são aplicados uma ou duas vezes ao dia. Os antifúngicos usados no tratamento da candidíase têm apresentando uma baixa eficácia, apesar do aumento no número de antimicóticos comercialmente disponíveis e encontra-se em desvantagem quando comparadas às drogas antibacterianas (COSTA et al., 2004).

Por isso, o uso de bactérias ácido lácticas, que por sua vez produzem metabólitos com potencial de inibir o desenvolvimento de agentes microbianos surge como uma promissora terapia alternativa para o tratamento da candidíase (MATSUBARA, 2016). Este grupo de bactérias é largamente encontrado na natureza, de fácil isolamento e a grande maioria das espécies não é patogênica. Assim, surgem como uma importante alternativa no controle de agentes patogênicos seja de origem bacteriana ou fúngica. Tamanini (2008) relata que ação inibitória desse micro-organismo se dá pela exclusão competitiva e/ou através da produção de uma gama de substâncias, resultantes do seu metabolismo, com potencial antimicrobiano, interferindo na sua capacidade de sobrevivência (bactericida) e/ou multiplicação (bacteriostática) de agentes microbianos.

Em estudos realizados por Martinez (2016) que fez uso de bactérias lácticas como um método para inibição da candidíase onde avaliaram a atividade antifúngica da *L. reuteri*, *L. rhamnosus* contra *C. albicans*, onde foi perceptível observar que as duas bactérias lácticas usadas no experimento foram capazes de inibir a multiplicação de *C. albicans* no tempo T=24h. Portanto, pode-se inferir que as bactérias lácticas possuem atividade antimicótica, e por serem amplamente utilizadas na fermentação de alimentos, é possível que não ofereçam riscos de efeitos colaterais em seres humanos.

Dessa maneira, este trabalho contribui com a pesquisa no controle da candidíase, sinalizando a melhor conduta metodológica nesse tipo de investigação, através da

proposta de comparar três técnicas *in vitro* de inibição bacteriana, com o intuito de avaliar qual destas técnicas se torna mais adequada para realizar pesquisa laboratorial no controle de crescimento da *Candida spp.* Sendo o método de antagonismo pela cultura mista (ou co-cultivo) através de testes laboratoriais, e os métodos de difusão em disco e do *spot-on the lawn* sendo fruto de estudo bibliográfico para comparar os resultados obtidos pelos três métodos.

MATERIAL E MÉTODOS OU METODOLOGIA (ou equivalente)

Os micro-organismos de referência utilizados foram 30 isolados de BAL provenientes da bacterioteca do Laboratório de Microbiologia Aplicada e Saúde Pública-LAMASP/UEFS sendo identificados na Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG (método proteômico do Mald Toff), e as linhagens de *C. albicans* CCMB 286 foram proveniente do Banco de coleção de cultura de micro-organismos da Bahia (CCMB/UEFS), situado no município de Feira de Santana. A *C. albicans* CCMB 286 liofilizada foi reativada em meio BHI (Brain Heart Infusion - DIFCO), por 48 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ (ANVISA, 2013). Após ativação foi armazenada em geladeira a temperatura de $6^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ até o momento de preparo e padronização para os testes.

Os isolados de bactérias ácidos lácticos foram ativados em caldo MRS (DE MAN: ROGOSA: SCHARP, 1960), e incubados por 48h a 35°C para a realização do ensaio de antagonismo. Para tal foi realizada um screening de inibição microbiana, confrontando trinta cepas de bactérias lácticas contra ao micro-organismo *C. albicans* CCMB 286, utilizando no método de cultura mista (ou co-cultivo)

O método de cultura mista consiste no princípio de ação inibitória de substâncias antimicrobianas produzidas por um micro-organismo visando impedir a proliferação de outro micro-organismo, formando um co-cultivo (SILVA, 2005). Neste caso, os compostos antimicrobianos são os metabólitos produzidos pelas bactérias lácticas durante o processo da fermentação. As bactérias lácticas foram ativadas em tubos contendo 10 mL de caldo MRS com incubação a 35°C por 48h. Após este período foi adicionado à cultura da *C. albicans* CCMB 286. Os tubos com a mistura dos dois micro-organismos foram mantidos no refrigerador a $6,0^\circ\text{C}$ por 24h. Posteriormente foi mistura e semeada em placas de Petri contendo 20 mL de meio de cultura BHI e incubada a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48h. Após este período foi observado se houve ou não crescimento do micro-organismo na placa. O controle negativo (ausência de efeito fungicida) foi realizado com água destilada estéril (1mL), e o controle positivo (presença de efeito fungicida) foi com medicamento comercial Gino-Canesten® (clotrimazol) na proporção de 1 mL.

Foi realizada pesquisa, nas bases de dados Scielo e Lilacs, de artigos relacionando antibiograma e candidíase e os métodos laboratoriais, entre 2000 e 2020. Utilizou-se o cruzamento das palavras-chave “bactérias lácticas”, “candidíase” e “antibiograma” com “melhor método metodológico”, em português, e “Lactic acid bacteria”, “candidiasis”, “antibiogram” e “best methodological method”, em inglês. Ressaltando que o método de cultura mista/co-cultivo foi realizada em testes em laboratórios e as demais técnicas que deveriam ser realizados *in vitro*, em função do isolamento social em decorrência da pandemia da COVID-19, foram resultados de uma pesquisa bibliográfica. Para tal, foram selecionados 32 artigos que estudaram a associação entre as bactérias lácticas e a candidíase, incluindo a conduta metodológica.

Oito referências não se enquadraram no critério de inclusão, mas foram utilizadas para a descrição de conceitos. Em seguida, procedeu-se à análise dos 24 artigos, agrupando-os em função das seguintes temáticas: Estudo bibliográfico sobre o método de antagonismos por difusão em disco e Estudo bibliográfico sobre o método *SPOT-ON-THE-LAWN* no teste de antagonismo.

RESULTADOS E/OU DISCUSSÃO (ou Análise e discussão dos resultados)

Os trinta isolados de Bactérias Ácidas Lácticas testadas no presente trabalho foram confirmados pelos testes preliminares de bactérias lácticas (morfologia de cocos ou bacilos, Gram-positivos e catalase negativo). Estas bactérias foram identificadas pelo método proteômico Maldi Tof. Na tabela 1 consta a relação destas bactérias. A morfologia de algumas não coincidem com a identificação das bactérias, pois algumas estão como *Lactobacillus*, que deveriam apresentar a morfologia de bacilos, mas estão como cocos e outras estão identificadas como *Enterococcus* e deveriam apresentar a morfologia de cocos, porém estão como bacilos. Vale ressaltar, que as BALs do gênero *Enterococcus* não produzem acidez suficiente para deixar a cultura com pH menor do que 4,0, o que está contradizendo com a identificação no Maldi Tof.

A inoculação dos isolados da linhagem de *C. albicans* CCMB 286 ocorreu com sucesso utilizando o meio BHI (Brain Heart Infusion - DIFCO), por 48 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ como esperado, pois, segundo a ANVISA (2004), recomenda-se para isolamento ou subcultivo de cândida o BHI. Após o crescimento a 35°C , foram observadas as características macroscópicas e microscópicas.

O isolado de *C. albicans* CCMB 286, em nível de aspectos macroscópicos apresentou colônia cor de creme, lisas e brilhantes (MARSHALL, 1995; JAWETZ et al., 1998; LACAZ et al., 1998). Em relação aos aspectos microscópicos, por sua vez, apresentou hifas verdadeiras e clamidósporos típicos, bem como afirma Ferreira e Ávila (2001).

Tabela 01. Resultado do Método de Cultura Mista proposto por Silva (2005)

Bactérias Lácticas	Morfologia (coloração de Gram)	pH	Atividade antifúngica
			Cultura mista
<i>Lactobacillus paracasei</i> *	Cocos+	5,1	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Bacilos+	3,5	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Bacilos+	3,5	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Bacilos+	3,6	-
<i>Enterococcus durans</i> *	Bacilos+	3,5	+
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Bacilos+	3,3	+
<i>Enterococcus faecium</i> *	Bacilos+	3,3	+
<i>Enterococcus faecalis</i> *	Bacilos+	3,5	-
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Cocos+	3,8	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Bacilos+	3,4	+
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Bacilos+	3,3	+
<i>Lactobacillus paracasei</i>	Bacilos+	3,5	+
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Bacilos+	3,3	+
<i>Enterococcus faecium</i> *	Bacilos+	3,5	+
<i>Enterococcus faecium</i> *	Bacilos+	3,6	+

<i>Lactobacillus plantarum</i>	Bacilos+	3,3	+
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Bacilos+	3,5	+
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Bacilos+	3,6	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Bacilos+	3,4	+
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Bacilos+	3,5	+
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Cocos+	3,6	+
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Bacilos+	3,5	+
<i>Enterococcus faecium*</i>	Bacilos+	3,5	+
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Bacilos+	3,4	+
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Bacilos+	3,3	+
<i>Enterococcus faecium*</i>	Bacilos+	3,8	-
<i>Enterococcus faecium*</i>	Cocos+	5,2	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Bacilos+	3,3	+
<i>Enterococcus faecalis*</i>	Bacilos+	3,5	+
<i>Lactobacillus paracasei</i>	Bacilos+	3,5	+

* A morfologia não condiz com a identificação da espécie pelo MALDI TOF.

** Crescimento reduzido 30-100; 21-x

Quanto aos ensaios de antagonismo, referente à ação das bactérias lácticas (BAL) sobre essa linhagem de *C. albicans* CCMB 286, pode-se observar na Tabela 1, que dentre as 30 linhagens de BAL testadas, 21 (70%) obtiveram inibição total e 09 (30%) inibição parcial. O que demonstra que as BAL podem representar bons agentes biológicos no controle da *C. albicans* CCMB 286 usado no teste que causam candidíase. O tratamento controle, sem adição da cultura, mas com a adição do fungicida Clotrimazol não apresentou uma boa proliferação no meio (Figura3). O Clotrimazol é um medicamento utilizado contra micoses superficiais e as que atingem a vagina, e é pertencente ao grupo dos fármacos de ação anti-infecciosos e antifúngicos. O Clotrimazol demonstrou boa ação, *in vitro*, contra infecções vaginais e dérmicas, sendo considerado um ativo potente contra *Candida spp.* (FURTADO, 1997).

Os mecanismos antagônicos observados podem ser resultantes de diferentes ações, como a produção de substâncias pelas bactérias que interferem no metabolismo e desenvolvimento de outro micro-organismo (PASINI, 2009). Outro fator que contribui para diminuição da quantidade de um dos micro-organismos localmente é a disputa por recursos alimentares (ALVES, 2007) e temos, também, a disputa por espaço para crescerem, onde um dos micro-organismos tende a colonizar mais rapidamente que o outro (SHARMA et al.,2009). Observando o pH das bactérias lácticas, que foram utilizadas nos ensaios é possível observar a variação entre 3,3 a 5,12, prevalecendo o pH mais baixo, já o controle com o antimicótico apresentou variação nos valores de pH entre 5,5 e 6,4, que é próximo ao ponto ótimo de crescimento de *candida spp.*. Ressaltando que pH entre 3 e 7 são importantes para a sobrevivência e infecção de espécies de *Candida* no hospedeiro (SCHALLER, 2006; MAYER et al., 2013). Considerando tais fatos, essa levedura é um exemplo de adaptação em estados fisiológicos extremos, podendo estar presente em diversos sítios do hospedeiro (CALDERONE & FONZI, 2001).

Estudo bibliográfico sobre o método de antagonismos por difusão em disco.

Uma grande variedade de métodos pode ser empregada para medir a atividade *in vitro* de micro-organismos contra os agentes antimicrobianos. Uma variedade de métodos é encontrada para esse efeito e como não são todos baseados no mesmo princípio, os resultados obtidos serão também profundamente influenciados, não só pelo método escolhido, mas também pelos micro-organismos utilizados para realizar o teste, e pelo grau de solubilidade de cada teste (VANDEN BERGHE & et al, 1991). Os principais métodos microbiológicos de detecção de atividade antimicrobiana encontrados na literatura tanto para detecção da atividade de bactérias como fungos podem ser classificados em três tipos: ensaios bioautográficos, de difusão e de diluição (RIOS & et al, 1988).

O método de disco-difusão é uma das abordagens, sendo considerado um dos testes com maior índice de uso na literatura. É adequado para testar a maioria dos patógenos bacterianos, incluindo as bactérias lácticas, mais comuns, é versátil em relação a gama de agentes antimicrobianos que podem ser testados e não requer equipamento especial (BrCAST-EUCAST, 2017).

Os ensaios de disco-difusão são métodos quantitativos, nos quais o efeito pode ser graduado. Fundamentam-se na difusão da substância a ser ensaiada, em um meio de cultura sólido e inoculado com o micro-organismo. A partir da difusão ocorre o aparecimento de um halo, no qual não há crescimento do micro-organismo, denominado halo de inibição. Diferentes tipos de reservatórios podem ser empregados incluindo discos de papel, cilindros de porcelana ou de aço inoxidável e poços feitos no meio de cultura (VANDEN BERGHE & VLIETINCK, 1991). A substância a ser testado é colocada em contato com o meio de cultura inoculado, e a maneira como se processa esse contato define os diferentes métodos de difusão, dentre eles, método do disco difusão, método dos cilindros e método de poços (RIOS & et al, 1988).

Em estudos realizados por Diogo (2010), no qual buscava avaliar a eficácia *in vitro* da terbinafina pelo método de difusão em disco contra fungos filamentosos e leveduras causadoras de micoses, foi concluído que existia uma alta eficácia da terbinafina em relação à inibição destes fungos. Em trabalho realizado por Bona (2014) utilizando a técnica de difusão em disco, foi possível inferir que existe uma diferença significativa entre os halos de inibição observados na metodologia de poço e do disco para a maioria das bactérias testadas em relação aos extratos aquosos e etanólicos de jambolão. No entanto, não foi verificada a inibição da levedura *C. albicans* por nenhuma técnica de difusão em disco. Ainda em trabalhos de Loguercio et al. (2005), ao avaliar a atividade antimicrobiana do extrato etanólico de *S.cumini* sobre cepas bacterianas de referência (*P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. albicans* e *K. pneumonia*), pelo método de disco-difusão em concentrações entre 50 e 300 mg.mL⁻¹, também observaram halo de inibição. Mamedio (2017) relatou em sua pesquisa na utilização da técnica de difusão em disco que as bactérias lácticas usadas em tal pesquisa que o efeito de inibição contra *F. guttiforme* não foi tão expressivo quando comparado ao controle, com o fungicida Derosal®, foi obtido como resultado halos de tamanhos variados nos mostrando que a atividade inibitória não foi tão eficaz. Corroboram com estudos de Bona (2014) que, na metodologia de poço, houve melhor difusão dos antimicrobianos, o que possibilitou a medição de halos maiores do que no teste de disco. Bem como pode ser influenciado no que descreve Lewis e Montville (1991) que os sobrenadantes de células liofilizadas de

BAL apresentaram boa atividade inibitória quando avaliada pelo método de difusão de poço. Isso provavelmente pode ser explicado pelo fato de a metodologia do poço propiciar mais facilidade de contato entre os antimicrobianos e os micro-organismos testados (Alves et al., 2008). Diante do exposto, é importante ressaltar que a técnica de difusão em disco é uma técnica preconizada pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards– NCCLS e está normatizada como parâmetro de análise antimicrobiana na Farmacopéia Brasileira, mas que deve ser levado em consideração suas particularidades como, por exemplo, o uso do disco imerso no caldo com BAL deixa resíduo adjacente ao disco, influenciando na medição dos halos e na concentração do próprio disco.

Estudo bibliográfico sobre o método *SPOT-ON-THE-LAWN* no teste de antagonismo

O método *spot-on-the-lawn* foi descrito por Lewus e Montville, (1991), e a partir daí tem sofrido modificações para melhor atender os que fazem uso do mesmo. No presente trabalho seria realizado de acordo com Rodrigo, (2005), que se baseia na semeadura de alíquotas de 5 µL das culturas puras de isolados do gênero *Lactobacillus*, na superfície do agar MRS, sendo as placas incubadas, não invertidas, a 37°C por 48 horas. Após o período de incubação, as placas são retiradas, e, na posição invertida, em cada tampa, colocada algodão embebido com 0,5 ml de clorofórmio para inativar a colônia. Depois de 30 minutos será retirado o algodão com clorofórmio e as placas serão levadas para a estufa a 37°C por 1 hora para evaporação do restante do clorofórmio.

Uma outra forma que se assemelha bastante com o método *spot-on-the-lawn* modificado por Rodrigo (2005) é o método de sobreposição de ágar duplo, pelo qual a cultura de bactérias lácticas produtora de bacteriocina (agente antibacteriano) é semeada na placa contendo ágar MRS e uma outra camada de meio BDA contendo cultura de *Cândida spp.* é semeada sobre a camada semeada pela bactéria láctica (FURTADO, 2010)

Atividade antifúngica de isolados de Bactérias Lácticas contra *Cândida spp.* pelo método de sobreposição de ágar duplo se apresenta uma ótima técnica descrita no trabalho realizado por Bulgasem (2016), no qual o crescimento de todas as *Cândida spp.* foram inibidos por todos os quatro isolados de bactérias lácticas de diferentes amostras de mel usados em seu trabalho, através do método de cobertura de ágar duplo, especialmente o crescimento de *C. glabrata* ATCC2001, onde essa levedura foi fortemente inibida por *P. pentosaceus* e *L. curvatus* isolados do mel Al-Maray, Iêmen e Al-Hanon, Líbia respectivamente. Enquanto o crescimento de *C. albicans* ATCC14053 e *C. tropicalis* ATCC750 foi moderadamente inibido por todos os isolados de BAL com zona inibidora (6 ~ 10 mm).

Neste estudo desenvolvido por Bulgasem et al. (2016), a BAL foi detectado em 10 das 15 amostras de mel com atividade antifúngica variável contra *Candida spp.* Quatro das BAL que apresentaram boas atividades antifúngicas contra *Candida spp.* foram identificados como *L. plantarum* HS, *P. acidilactici*, *L. curvatus* e *P. pentosaceus*. Atanassova et al. (2003), relataram que *L. paracasei* subsp. *paracasei* apresentou atividade antifúngica contra *C. albicans*, *C. pseudointermedia* e *C. blankii*. Da mesma forma, Jin et al. (2007) também observaram que cepas de *Pendiococcus sp.* apresentou forte atividade antifúngica contra *C.*

albicans ATCC10231 e *C. parapsilosis* ATCC22019, mas moderada atividade contra *C. tropicalis* ATCC13803 e *C. kefir* ATCC46764. Ogunshe et al. (2011), utilizando a técnica de sobreposição de camadas, relataram que *L. acidophilus* e *L. plantarum* vaginal teve atividade antifúngica contra cepas de *Candida* spp. Ainda no estudo desenvolvido por Bulgasem (2016) o *L. plantarum* isolada do mel do Seder, a Líbia mostrou atividade antifúngica contra *Candida* spp. especialmente *C. albicans*. Da mesma forma, Adeniyi e Iveren (2011) relataram que o isolado de *L. plantarum* proveniente de vegetais frescos de salada teve maior atividade antifúngica contra *C. albicans* ATCC90029 com zona de inibição (25 mm). Assim, pode observar o método de sobreposição de ágar duplo, que segue o mesmo princípio do método *spot-on-the-lawn* é um importante método de avaliação contra *Candida* spp.

O método de “*spot-on-the-lawn*” é considerado um importante método de avaliação contra *Candida* spp. Porém, segundo Lewis e Montville (1991), o método apresenta um grande número de resultados falsos-negativos e são considerados mais trabalhosos

CONSIDERAÇÕES FINAIS (ou Conclusão)

Avaliando o método de cultura mista (co-cultivo) para detecção do antagonismo das bactérias lácticas sobre a *C. albicans* CCMB 286 pode-se inferir que estas bactérias exercem efeito inibitório sobre as leveduras testadas, e se aplicasse a técnica de difusão em disco, talvez não seria muito eficiente, pois o uso do disco imerso no caldo com bactérias lácticas deixa resíduo no disco, influenciando na difusão do princípio ativo da inibição no meio, o mesmo podendo acontecer com o método de “*spot-on-the-lawn*” .

REFERÊNCIAS

- Adeniyi B, Iveren D. **Antifungal capacity of lactic acid bacteria isolated from salad vegetables**. Afr J Biomed Res 2011;14:137-41.
- ANVISA. «Descrição dos Meios de Cultura Empregados nos Exames Microbiológicos» (PDF). Consultado em 22 de junho de 2020.
- Atanassova M, Choiset Y, Dalgalarondo M, Chobert JM, Dousset X, Ivanova I, Haertlé T. Isolation and partial biochemical characterization of a proteinaceous anti-bacteria and anti-yeast compound produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* strain M3. Int J Food Microbiol 2003;87:63- 73.
- BARBEDO, L.S; SGARBI, D.B.G. Candidíase. **Jornal brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 1, p. 22-38, 2010.
- BAUER, A.W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Microbiol., 40: 2413-5, 1966.
- Bulgasem BY, Hassan Z, Abdalsadiq NK, Yousoff WM, Musa EM, Lani MN. Anti-adhesion activity of lactic acid bacteria supernatant against human pathogenic *Candida* species biofilm. Health Sci J 2016;9:3
- CALDERONE, R.A.; FONZI, W. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*, v. 9, n.7, p. 327-31, 2001.
- Cizeikiene D, Juodeikiene G, Paskevicius A, Bartkiene E. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from food and their control in wheat bread. Food Control 2013;31:539-45.

Costa M, Passos XS, Miranda ATB, de Araújo RSC, Paula CR, Silva MRR. **Correlation of in vitro itraconazole and fluconazole susceptibility with clinical outcome for patients with vulvovaginal candidiasis.** Mycopathol 2004; 157: 43-47.

DJABOU, N LORENZI, V.; GUINOISEAU, E.; ANDREANI, S.; GIULIANI, M. C.; DESJOBERT, J. M.; BOLLA, JM.; COSTA,. Phytochemical composition of Corsican Teucrium essential oils and antibacterial activity against foodborne or toxi-infectious pathogens. **Food Control**, Guildford, v. 30, n. 1 , p. 354-368, 2013.

FERREIRA, A. W.; ÁVILA, S. L. M. **Diagnóstico laboratorial**: 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 443 p.

Jin L, Tao L, Pavlova SI, So JS, Kiwanuka N, Namukwaya Z, Saberbein BA, Wawer M. Species diversity and relative abundance of vaginal lactic acid bacteria from women in Uganda and Korea. *J Appl Microbiol* 2007;102:1107-15.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; HEINZ-VACCM, E. M. et al. **Guia para identificação fungos - actinomicetos - algas de interesse médico.**1998. 433 p.

Laref N, Guessas B. **Antifungal activity of newly isolates of lactic acid bacteria.** *Innov Rom Food Biotechnol* 2013;13:80- 8.

LEWUS, C.B.; KAISER, A.; MONTIVILLE, T.J. Inhibition of Food-Borne Bacterial Pathogens by Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria Isolated from Meat. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.57, p.1683-1688, 1991.

MARSHALL, J. R **Manual de laboratório clínico: microbiologia.** São Paulo: Livraria Ed. Santos, 1995. 161 p.

MARTINEZ, Rafael Chacon Ruiz. **Efeito da utilização de culturas lácticas probióticas na microbiota vaginal de pacientes acometidas por infecções bacterianas e fúngicas.** 2008.

MATSUBARA, Victor Haruo. **Efeito de bactérias probióticas sobre Candida albicans: ensaios em cultura de macrófagos e de biofilme.** 2016. Tese (Doutorado em Prótese Dentária) - Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016. doi:10.11606/T.23.2016.tde-04112016-110527. Acesso em: 2020-07-11.

pathogens: Lactic streptococci versus staphylococci and salmonellae. *J. Milk Food Technol.*, Amsterdam, v.35: 307–310, 1972.

MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119–28, 2013.

Ogunshe AA, Omotoso MA, Bello VB. The in vitro antimicrobial activities of metabolites from Lactobacillus strains on Candida species implicated in Candida vaginitis. **Malays J Med Sci** 2011;18:13-25.

Oluwafemi F, Adetunji AF. **Antimicrobial activities of lactic acid bacteria isolated from traditionally-fermented maize (ogi) against Candida albicans.** *J Appl Biosci* 2011;41:2820-35

RIOS, J.L.; RECIO, M.C.; VILLAR, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *J. Ethnopharmacol.*, v. 23, p. 127-149, 1988.

SCHALLER, M. *Candida albicans*--interactions with the mucosa and the immune system.**Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG**, v. 4, n. 4, p. 328-36–8, 2006.

TAMANINI, R. **Bactérias ácido lácticas com atividade antagonista a *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* em leite cru produzido no estado de Pernambuco.** 2008. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2008.

VANDEN BERGHE, D. A.; VLIETINCK, A. J. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In: DEY, P. M.; HARBONE, J. D. (Ed.), *Methods in Plant Biochemistry*, London: Academic Press, 1991. p. 47-69.