

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EXTRATO DA PRÓPOLIS COMO POSSÍVEL FONTE DE TRATAMENTO PARA CANDIDÍASE VULVOVAGINAL

IN VITRO EVALUATION OF EXCERPT FROM PROPOLIS AS POSSIBLE SOURCE OF TREATMENT FOR VULVOVAGINAL CANDIDIASIS

Grazielle Caroline Alonso **LUPION**^{1*}, Daiane Pereira **CAMACHO**², Melyssa **NEGRI**³

1. Acadêmica do Curso de Graduação em Biomedicina da Faculdade INGÁ; 2. Biomédica, Mestre em Análises Clínicas, Coordenadora do Curso de Graduação em Biomedicina da Faculdade INGÁ; 3. Professora Doutora do Curso de Graduação em Medicina e Odontologia da Faculdade INGÁ.

* Rua Emilio Beltrami Filho, 379, Parque da Gávea, Maringá, Paraná, Brasil. CEP 87053-337. grazii_lupion@hotmail.com

Recebido em 20/06/2013. Aceito para publicação em 25/07/2013

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar *in vitro* o potencial antifúngico do extrato da própolis, como possível fonte de tratamento para mulheres com candidíase vulvovaginal (CVV), impregnado em tecido de algodão sobre o crescimento de duas cepas *Candida albicans*: uma isolada de CVV e uma outra de referência (ATCC 90028). Pedacos de tecido de algodão estéreis (2 x 2 cm) foram impregnados com extrato da própolis em diferentes diluições, ou utilizados sem a impregnação com própolis (controle). Os tecidos, após a impregnação, foram colocados em contato com semeaduras de *C. albicans*, por 24 horas, em dois meios de cultura: um meio sólido (ágar Sabouraud) e um meio líquido (caldo de Peptona 10%). Após este período, não foi possível observar inibição do crescimento do *C. albicans* no meio sólido. Porém, após a contagem em placa no meio líquido, observou-se uma redução de 96% do crescimento de *C. albicans* (cepa de referência) em tecidos impregnados, em relação ao respectivo controle positivo. Com base nos ensaios, que simulam uma situação próxima da microbiota vaginal com pH ácido e poucos nutrientes, é possível sugerir que o extrato da própolis impregnado em tecido de algodão, possui propriedades antifúngicas perante a espécie de *Candida albicans*.

PALAVRAS-CHAVE: *Candida albicans*, Candidíase vulvovaginal, Própolis

ABSTRACT

This work aimed to evaluate the *in vitro* antifungal activity of the propolis extract as a possible source of treatment for women with vulvovaginal candidiasis (VVC), impregnated cotton fabric on the growth of two strains of *Candida albicans*: one isolated from VVC and a another reference (ATCC 90028). Pieces of sterile cotton fabric (2 x 2 cm) were impregnated with propolis extract in different dilutions, or used without

impregnation (control). Tissues, after impregnation, were placed in contact with *C. albicans* for 24 hours in two different culture media: solid medium (Sabouraud agar) and a liquid medium (peptone broth 10%). After this period, in solid medium, the inhibition was not observed for *C. albicans*. However, in the liquid medium, there was a 96% reduction in growth of *C. albicans* (reference strain) in tissues impregnated in relation to the respective positive control. Based on the tests, which simulate a situation close to the vaginal microbiota with acidic and low in nutrients, it is possible to suggest that the propolis extract impregnated cotton fabric, has antifungal properties against to *Candida albicans*.

KEYWORDS: *Candida albicans*, vulvovaginal candidiasis, Propolis.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Candida* é classificado como fungo imperfeito, subdivisão *Deuteromycota*, classe *Blastomycetes* e família *Cryptococcaceae*¹. Possuem distribuição universal e mais de 200 espécies têm sido descritas. Aproximadamente 10% dessas espécies são consideradas patogênicas, sendo a maioria isolada como microbiota normal da pele, trato gastrointestinal, trato geniturinário, trato respiratório, bem como ambiente, particularmente em superfícies inanimadas².

Candida é um micro-organismo saprófito, que, na dependência de fatores predisponentes, os quais alteram sua integridade orgânica e sua sobrevivência naquele ambiente, modificam sua conformação leveduriforme para uma forma filamentosa, com presença de grande clamidosporos com paredes espessas. Desta forma acabam tornando-se patogênicas oportunistas ao seu hospedeiro³. Os quadros clínicos mais rotineiramente reporta-

dos relacionados à candidíase (doença causada por espécies de *Candida*) são a do tipo cutâneo-mucosa, sistêmica/visceral e alérgica^{4,5}. Os gêneros mais comuns são *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. stellatoidea*, *C. tropicallis* e *C. albicans* sendo este último, o agente etiológico mais frequente.

Candida albicans encontra-se em todo o Mundo, é uma espécie responsável pela maioria das candidíase, além de estar presente como microbiota normal vaginal, cavidade oral, tubo digestivo e intestino^{4,6}. Esta capacidade de causar algum dano ao hospedeiro é devido sua virulência estando relacionada com a aderência a células epiteliais e com a produção de enzimas^{3,7}. Porém, não só dependendo das características da *Candida*, mais também das condições do hospedeiro e do meio em que se encontra, como idade, gravidez, calor, umidade, pH, diabéticos, obesidade, desnutrição, leucemias, linfomas, anemias, entre outros o que traduz a interação entre o microrganismo e o hospedeiro⁶. A candidíase vulvovaginal ocorre principalmente em mulheres que estão na menopausa e na puberdade. Caracterizada pela presença de lesões na vulva e na vagina, com presença de prurido, ardência e secreção de cor branca. Estima-se que 75% das mulheres apresentaram pelo menos um episódio de vulvovaginite fúngica em suas vidas, excluindo as assintomáticas⁸.

Outro fator importante, além da alta incidência, na atualidade, de candidíase vulvovaginal em as mulheres jovens, com frequência, as infecções fúngicas são de difícil tratamento, fato intrinsecamente relacionado à aquisição por parte de seus agentes etiológicos de resistência frente à ação de antifúngicos⁹.

Nos últimos anos, efeitos farmacológicos tem sido estudados e avaliados como fonte alternativa de tratamento para várias doenças que acometem o homem, como neste caso, infecções causadas por *C. albicans*. Desta forma este trabalho pretende avaliar o efeito que a própolis tem sobre esta espécie.

A própolis é elaborada pelas abelhas a partir de resinas retiradas de broto, exsudatos e outras partes do tecido vegetal. Possui grande complexidade química, é considerada uma das misturas mais heterogêneas já encontradas em fontes naturais. A composição da própolis varia dependendo do ambiente em que a colmeia fica, do clima, temperatura, vegetação, entre outros. Porém, em geral, a própolis é composta de: 50 -55% de resina de árvores e outras substâncias resinosas; 25-35% cera produzida pelas abelhas, em seguida, incorporada; 10% de óleos essenciais; 5% de pólen de flores e 5% de diversos materiais orgânicos (madeira, plantas e minerais). Dentre as substâncias presentes na própolis destacam-se os flavonóides, os quais são indicados como responsáveis pelas ações anti-inflamatória, anti-microbiana e, em especial pela anti-fúngica¹⁰.

A própolis é um produto que tem sido amplamente

utilizado ao longo da história.. Entretanto, só nos anos 1950 e 1960 na ex-União Soviética e em países do leste da Europa, como Bulgária, República Tcheca e Polônia, a própolis começou a ser apreciada e relatada como uma fonte alternativa para tratamentos de problemas de saúde. Nos países do oeste europeu, na América do Norte e no Japão, a própolis não adquiriu popularidade até 1980. No Brasil, o interesse pela própolis aconteceu devido ao trabalho pioneiro de Ernesto Ulrich Breyer, demonstrado em seu livro, "Abelhas e saúde", as propriedades terapêuticas da própolis e seu uso como antibiótico natural¹¹. O Japão é o principal importador de própolis, com preferência pela própolis brasileira¹².

Contudo, o efeito antimicrobiano do extrato da própolis, foi observada por Fernandes (2006)¹³, sobre espécies que acometem o homem por condições oportunistas onde estudaram a sensibilidade, destes isolados, em ágar com concentrações de EAPs (extrato alcoólico da própolis) em %v/v (% vol.EAP/vol. meio), afim de determinar a concentração inibitória mínima (CIM). Sforcin (2001)¹⁴ e Abrahão (2008)¹⁵ também confirmaram que há ação antifúngica do extrato sobre a espécie de *C. albicans* através de experimentos *in vitro* e utilizando baixas concentrações da própolis.

Desta forma, este trabalho pretende avaliar, *in vitro*, o efeito da própolis impregnado em tecido de algodão sobre *Candida albicans* e correlacionar os resultados obtidos com os de trabalhos anteriores, promovendo assim um reforço para uma possível fonte alternativa de tratamento da candidíase vulvovaginal.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Condições de crescimento para *Candida albicans*

No presente estudo foram utilizados dois isolados de *Candida albicans*. Um isolado clínico proveniente de candidíase vulvovaginal, cordialmente fornecido pela Micoteca do Laboratório de Micologia Médica da Universidade Estadual de Maringá. Outro isolado obtido da *American Type Culture Collection* (ATCC), referência 90028. Antes dos ensaios, os isolados foram cultivados em ágar Sabouraud (HIMEDIA®, São Paulo, Brasil) a 25 °C por 24 horas. Após este período, usou-se uma colônia isolada e dilui-se em solução salina a 0,8% para contagem do inoculo em câmara de Neubauer.

Preparo do tecido de algodão

O tecido, composto por fibras de algodão 100%, comprado no comércio varejista de Maringá-PR foi lavado por 3 vezes com água destilada para retirada de possíveis impurezas aderidas ao tecido. Após as lavagens, permaneceu durante 30 minutos em contato com a água destilada. Em seguida foi retirado da água e seco em

temperatura ambiente. Para os ensaios, o tecido foi recortado em pequenos quadrados (2 x 2 cm). Em um lado só do tecido foi colocado uma fita dupla face. Ao término da colagem, os quadrados foram individualmente embalados e autoclavados (121 °C) e secos em estufa estéril.

Extrato da própolis e diluição

O extrato seco da própolis mínimo:11% da marca Apiários 2G da região de Londrina-PR foi diluído em água destilada estéril até 1:1000.

Tratamento do tecido de algodão com as diluições do extrato puro

Após a secagem em estufa, com auxílio de uma pinça estéril, o tecido foi colado ao fundo de uma placa de Petri. Em seguida, adicionou-se a solução da própolis na placa, sendo uma placa para cada diluição. O tecido ficou em contato por 24 horas a temperatura ambiente. Para o controle do efeito da própolis sobre o microrganismo, o mesmo foi feito com tecidos sem própolis, adicionando-se apenas água destilada estéril. Após este período do contato, cada placa contendo o tecido foi lavada com água destilada estéril, para retirar o excesso da solução e colocada para secagem em estufa estéril.

Ensaio em meio sólido (Agar Sabouraud)

Foi utilizado uma concentração de *C. albicans* de $1,8 \times 10^6$ leveduras/mL, quantificada em câmara de Neubauer. Realizou-se a semeadura de estrias contínuas de *C. albicans* em agar Sabouraud. Logo após a semeadura, foram aderidos 4 tecidos tratados a superfície do meio. Um dos tecidos, sem tratamento com própolis, foi utilizado como controle positivo. Os outros 3 tecidos continham as respectivas diluições do extrato 1:10, 1:100 e 1:1000. As placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas. Para cada diluição o procedimento foi realizado em duplicata.

Ensaio em meio líquido (Caldo de Peptona 10%)

Foi preparado um meio contendo 10% de Peptona (HIMEDIA®, São Paulo, Brasil) com pH 5,7. Neste meio, foi preparado um pré-inóculo, semeado com um alça não calibrada, de *C. albicans* do cultivado em agar Sabouraud e incubado a 27 °C por 24 horas.

No dia seguinte, o caldo foi centrifugado a 1500 rpm por 4 minutos. Após a centrifugação, foi desprezado o sobrenadante e completado com salina a 0,8% e centrifugado novamente por duas vezes.

Por fim, acertou-se o inóculo utilizando-se câmara de Neubauer a 1×10^3 leveduras/mL em 10 mL de caldo Peptona 10%. Para cada frasco contendo caldo Peptona 10% com *C. albicans*, foi colocado um quadrado de tecido impregnado com extrato da própolis, um com diluição de 1:10 e outro com o extrato puro, sendo sempre

realizado o controle (tecido sem tratamento com a própolis). Este ensaio foi realizado em duplicata e todos os frascos foram incubados a 27 °C por 24 horas.

Após as 24 horas de crescimento cada solução contida nos frascos foi semeada com alça calibrada 0,1 microlitros em agar Sabouraud com a finalidade da realização de contagem das unidades formadoras de colônias (UFC). O frasco sem própolis (controle) também foi semeado da mesma maneira para a contagem de UFC. Deixou-se por mais 24 horas em 27 °C. Ao término da incubação cada placa foi contada manualmente no contador de colônia (Phoenix modelo CP 608, Brasil).

3. RESULTADOS

Foi possível observar, para os ensaios em meio sólido, um crescimento de 100% das colônias de *C. albicans* sob o tecido de algodão impregnado com a própolis.

Já nas seguintes situações (extrato puro e 1:10, inóculo na concentração 1×10^3 leveduras/mL e em caldo peptona 10%) a ação antifúngica da própolis impregnado em tecido de algodão sobre *C. albicans*, diminuiu consideravelmente, após o contato por 24 horas (Fig. 1A-D).

Constatou-se que o isolado clínico na diluição 1:10 apresentou uma inibição de 61% e no extrato puro 85%. Já a cepa de referência ATCC apresentou maiores percentagens de inibição 65% (extrato diluído 1:10) e 96% (extrato puro).

4. DISCUSSÃO

Como já é de conhecimento, o efeito antimicrobiano do extrato da própolis sobre *Candida albicans*^{10,15,16,17} e a eficácia no tratamento de infecções com a utilização de materiais impregnados com antimicrobianos^{18,19,20}, a proposta deste trabalho foi avaliar *in vitro* o efeito da própolis, impregnado em tecido de algodão, sobre *Candida albicans* como uma possível alternativa de tratamento para candidíase vulvovaginal (CVV). Uma vez que, esta patologia, é atualmente um relevante problema na saúde da mulher, principalmente em casos de ocorrência de quatro ou mais episódios de CVV no período de 12 meses podendo, este fato, estar relacionado a uma elevação na resistência de espécies de *Candida* aos fármacos comuns^{21,22}.

Infelizmente, há pouca literatura sobre a utilização de tecido de 100% algodão como fonte de antifúngico para tratamento de CVV.

Porém, sabe-se que a maioria das fibras do tecido aderem 100% com a substância trabalhada, não impedindo a manipulação deste durante os procedimentos clínicos.

Sabe-se ainda que pode haver perda de pequenas quantidades da substância, mas não relatado que esta

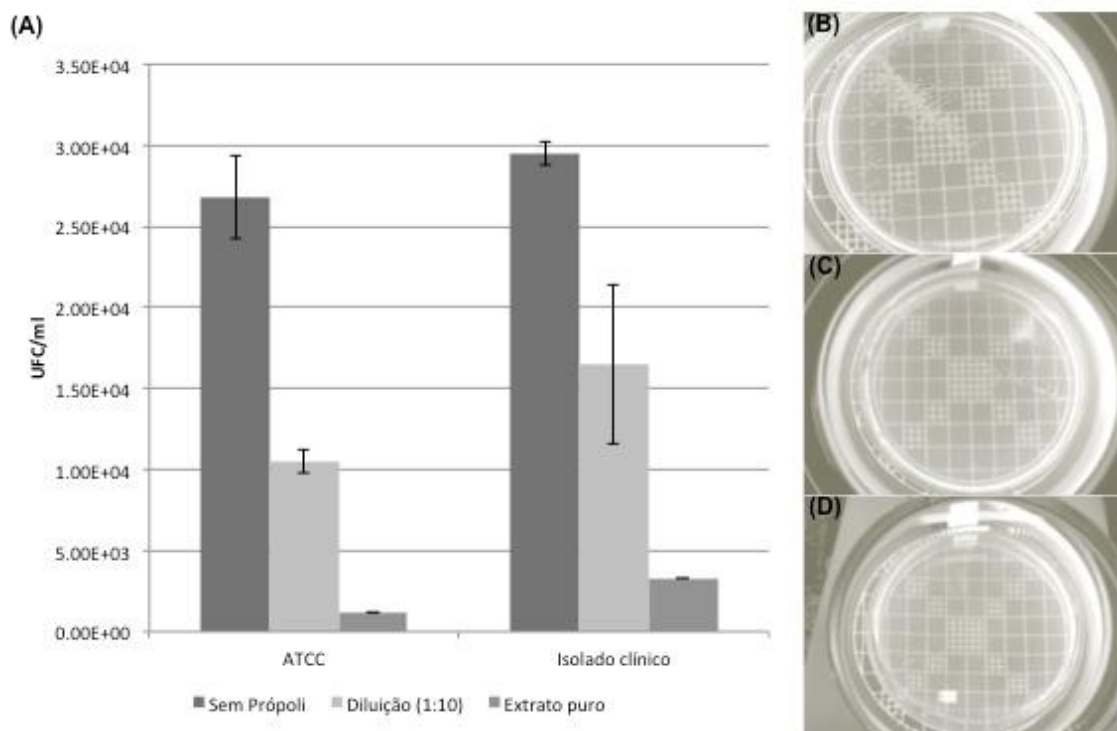


Figura 1: *Candida albicans* após contato com tecido de algodão impregnado com extrato da própolis A) Avaliação antifúngica de extrato puro e diluído da própolis; B) Unidade formadora de colônias de *C. albicans* após contato com tecido de algodão sem própolis; C) Unidade formadora de colônias de *C. albicans* após contato com tecido de algodão impregnado com extrato da própolis na diluição 1:10. D) Unidade formadora de colônias de *C. albicans* após contato com tecido de algodão impregnado com extrato da própolis puro.

perda influencie drasticamente os procedimentos e a inibição perante os microrganismo¹.

No presente estudo, primeiramente foi realizado um ensaio em meio sólido contendo *C. albicans* em contato com tecidos de algodão previamente tratados com diferentes diluições (1:10, 1:100 e 1:1000) do extrato da própolis proveniente da região de Londrina-PR, afim de, selecionar a diluição ideal que fosse capaz de inibir o crescimento de *C. albicans* na concentração de $1,8 \times 10^6$ leveduras/mL. Porém, nestas condições, constatou-se o crescimento de 100% das colônias de *C. albicans* sob o tecido de algodão impregnado com a própolis, resultando assim na não eficácia do mesmo perante este fungo. Não se sabe ao certo o porquê da não inibição do extrato sobre *C. albicans* em meio sólido, uma possível explicação seria relacionada ao ambiente, por possuir alto teor de nutrientes (ágar Sabouraud), favorecendo assim ainda mais a proliferação do fungo. Deve-se ressaltar, também, que a ação inibitória da própolis contra micro-organismos encontra-se relacionada à sua composição química, sendo os flavonóides apontados como os

principais compostos responsáveis por essa propriedade¹⁰.

Entretanto, segundo os estudos, *in vitro*, realizados por Sforcin *et al.* (2001)¹⁴ e Abrahão *et al.* (2008)¹⁵, diferentes concentrações da própolis podem influenciar na ação antifúngica sobre *C. albicans*, corroborando com os achados de Fernandes (2001)¹³, em que observou o efeito antimicrobiano do extrato da própolis, sobre espécies que acometem o homem por condições oportunistas, em ágar com concentrações de extrato alcoólico da própolis (EAPs) em %v/v. Logo, ensaios posteriores realizados no presente estudo, apresentaram-se uma abordagem mais positiva para a inibição, diferenciando: diluição da própolis (extrato puro e 1:10); concentração do inóculo (1×10^3 leveduras/mL); e meio de cultura (caldo peptona 10%).

De acordo com os resultados obtidos no ensaio em meio sólido, resolveu-se realizar apenas uma diluição, pois, conforme descrito em outros trabalho, a concentração da própolis difere de acordo com a região, a época e o modo como a própolis foi coletada e preparada, podendo atingir valores de até 10% como o caso da própolis europeia¹⁰.

A redução do inóculo de $1,8 \times 10^6$ leveduras/mL para 1×10^3 leveduras/mL (Figura 2) foi seguindo os critérios do *Clinical Laboratory and Standards Institute* (CLSI)²³ documento M 27-A3, o qual, recomenda a concentração do inóculo para teste de sensibilidade *in vitro* de $0,5$ a $2,5 \times 10^3$ UFC/mL. A escolha de outro meio de cultura fora usado com intuito de criar um am-

biente com semelhança à microbiota vaginal como o baixo pH²⁴, como já observado em outros trabalhos, nos quais utilizaram meios mimetizando o real^{25,26}.

Na Figura 1, observa-se ação antifúngica da própolis impregnado em tecido de algodão sobre *C. albicans*, em relação ao controle (inoculo em contato com tecido de algodão sem própolis), onde o número de unidade formadora de colônia diminui consideravelmente, após o contato por 24 horas (Fig. 2, 3 e 4). Em um estudo realizado Dalben-Dota *et al.* (2009)²² também constataram a ação antifúngica da própolis em 91 isolados de exsudatos vaginal, incluindo um isolado resistente a nistatina (típico antimicótico administrado em mulheres com CVV).

Constatou-se que o isolado clínico na diluição 1:10 apresentou uma inibição de 61% e no extrato puro 85%. Já a cepa de referência ATCC apresentou maiores percentagens de inibição 65%, Figura 3 (1:10) e 96%, Figura 4 (extrato puro). Esta diferença se deve a relação a diferentes cepas existentes e trabalhadas, como observado também no trabalho de Dalben-Dota *et al.* (2009)²⁸, que conferiu o potencial antifúngico da própolis em pacientes assintomáticas e sintomáticas, em comparação ao medicamento nistatina. Obtendo resultados positivos ao uso da própolis perante a CVV. Além disso, pode estar relacionado ainda com sítio de isolamento e também a patologia do agente em questão, relatado no estudo de Tamura *et al.* (2007)²⁷, que ressalta a capacidade da levedura em aderir, infectar e causar doença, através de seu potencial de virulência ou patogenicidade, determinados pelos fatores de virulência geneticamente expressos quando submetidos a certas condições.

5. CONCLUSÃO

Assim, o conjuntos dos resultados do presente estudo permite sugerir que o extrato da própolis utilizado possui ação antifúngica quando impregnado em tecido 100% algodão sobre a espécie *Candida albicans* presente na microbiota vaginal. Ressaltando a importância para novas fontes alternativas de tratamentos não só para candidíase vulvovaginal, mas para patologias nas quais são ocasionadas por fungos. Entretanto, é importante ressaltar a necessidade mais estudos na área, com maior número de isolados clínicos afim de consolidar estes achados.

REFERÊNCIAS

- [1] Blackwell M. The Yeasts, A Taxonomic Study, fourth edition, by C.P. Kurtzman and J.W. Fell. Mycopathologia. 2001;149(3):157-8.
- [2] Eggimann, P, Garbino J, Pittet D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. Lancet Infect Dis 2003; 3(11):685-702
- [3] Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. FEMS Microbiol Rev 2012;36:288-305.
- [4] Lacaz CS. Micologia Médica. São Paulo: Sarvier Pereira, 1991
- [5] Sidrim, JJ. *et al.* Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- [6] Esteves, JA, Cabrita JD, Nobre GN. Micologia médica. 2º ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1990.
- [7] Williams D, Lewis M. Pathogenesis and treatment of oral candidosis. J Oral Microbiol 2011;3:5771.
- [8] Martins HP, da Silva MC, Paiva LC, Svidzinski TI, Consolaro ME. Efficacy of fluconazole and nystatin in the treatment of vaginal *Candida* species. Acta Derm Venerol 2012;92(1):78-82.
- [9] Araújo JCLV. *et al.* Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microrganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. Ver Patol Trop 2004; 33(4): 55-64.
- [10] Sonmez S. *et al.* The effect of bee propolis on oral pathogens and human gingival fibroblast. J Ethnopharm 2005; 102:371-376.
- [11] Lima IO. *et al.* Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. Ver Bras Farmacogn. 2006; 16(2): 197-201
- [12] Salatino A, Teixeira EW, Negri G, Message D. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. CAM 2005;2: 33-38.
- [13] Fernandes JA, Leomil L, Fernandes AAH, Sforcin JM. The antibacterial activity of propolis produced by *Apis mellifera* L. and Brazilian stingless bees. J. Venom. Anim. Toxins 2001;7(2):173-182.
- [14] Sforcin JM. *et al.* Seasonal effect of Brazilian propolis on *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. J Venom Anim Toxins v.7, n.1, 2001.
- [15] Abrahao DS. *et al.* Atividade dos extratos de própolis sobre o comportamento morfológico de *Candida albicans* e como medicação intracanal. Bol Epidemiol Paul 2008;5(60): 23-23.
- [16] Mattigatti S. *et al.* Antimicrobial Effect of Conventional Root Canal Medicaments vs Propolis against *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. J Contemp Dent Pract 2012;13(3):305-9.
- [17] Barbosa MH. *et al.* Ação terapêutica da própolis em lesões cutâneas. Acta Paul Enferm 2009;22(3):318-322.
- [18] Borkow G, Gabbay J. Putting copper into action: copper-impregnated products with potent biocidal activities. Faseb J 2004;18(14):1728-30.
- [19] Ragonha ACO, Ferreira E, Andrade D, Rossi LA. Avaliação microbiológica de coberturas com sulfadiazina de prata a 1%, utilizadas em queimaduras. Rev Latino Am Enfermagem 2005;13(4):514-21.
- [20] Humphreys H. New technologies in the prevention and control of healthcare-associated infection. J R Coll Physicians Edinb 2010;40(2):161-4.
- [21] Alvares CA. *et al.* Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. J Bras Patol Med Lab 2007;43(5):319-327.

- [22] Dalben-Dota KF. *et al.* Antifungal Activity of Propolis Extract Against Yeasts Isolated from Vaginal Exudates. J Alt Comp 2009;16(3):285–290.
- [23] Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI). Reference Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts: Approved guideline M44-A. Wayne, PA, EUA: NCCLS, 2004.
- [24] Linhares IM. *et al.* Novos conhecimentos sobre a flora bacteriana vaginal. Rev Assoc Med Bras 2010;56(3): 370-4.
- [25] Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams D, Azeredo J. Silicone colonization by non-*Candida albicans* *Candida* species in the presence of urine. J Med Microbiol. 2010;59(7):747-54.
- [26] Pizzolitto EL. *et al.* Formação de biofilme cristalino de *Proteus mirabilis* em cateter urológico. Rev Bras Eng Biom 2010;26(2):91-98.
- [27] Tamura NK, Negri MFN, Bonassoli LA, Svidzinski TIE. Fatores de virulência de *Candida* spp isoladas de cateteres venosos e mãos de servidores hospitalares. Rev Soc Bras Med Trop 2007;40(1):91-3.

