



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
EM SAÚDE HUMANA E ANIMAL
MESTRADO PROFISSIONAL EM BIOTECNOLOGIA
EM SAÚDE HUMANA E ANIMAL

MARCILEIDE DA SILVA SANTOS

EFEITO DA ADIÇÃO DE ÁGUA DE COCO EM PÓ NO ENRIQUECIMENTO
DE MEIO DE CULTURA PARA *Candida albicans*

MACEIÓ – ALAGOAS

2022

MARCILEIDE DA SILVA SANTOS

EFEITO DA ADIÇÃO DE ÁGUA DE COCO EM PÓ NO ENRIQUECIMENTO
DE MEIO DE CULTURA PARA *Candida albicans*

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Biotecnologia. Área de Concentração: Biotecnologia em Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Valesca Barreto Luz.

Coorientadora: Profa. Dra. Camila Calado de Vasconcelos.

MACEIÓ – ALAGOAS

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Estadual do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Santos, Marcileide da Silva.

Efeito da adição de água de coco em pó no enriquecimento de meio de cultura para *Candida albicans* [recurso eletrônico] / Marcileide da Silva Santos. - 2022.

51 f. : il.

Dissertação (MESTRADO PROFISSIONAL) - Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Curso de Programa de Pós-graduação Em Biotecnologia Em Saúde Humana E Animal Nível Mestrado, Maceió, 2022.

Orientação: Prof.^a Dra. Valesca Barreto Luz.

Coorientação: Prof.^a Dra. Camila Calado de Vasconcelos.

1. Diagnóstico clínico. 2. Fungo oportunista.
3. Crescimento celular. I. Título.

MARCILEIDE DA SILVA SANTOS

EFEITO DA ADIÇÃO DE ÁGUA DE COCO EM PÓ NO ENRIQUECIMENTO
DE MEIO DE CULTURA PARA *Candida albicans*

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial a obtenção ao título de mestre em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal. Área de Concentração: Biotecnologia em Saúde.

Aprovada em: 04 de março de 2022.

BANCA EXAMINADORA




Profa. Dra. Valesca Barreto Luz (Orientadora) Centro
Universitário Cesmac - CESMAC



Prof. Dr. Rodrigo Antônio Torres Matos
Centro Universitário Cesmac - CESMAC



Profa. Dra. Camila Calado de Vasconcelos
Centro Universitário Cesmac - CESMAC



Prof. Dr. Axel Helmut Rulf Cofré
Centro Universitário Cesmac – CESMAC

Dedico este trabalho aos meus pais, minha irmã e meu filho que estiveram, estão, e sei que sempre estarão ao meu lado, pois tudo o que sou devo a eles.

AGRADECIMENTOS

Meu primeiro agradecimento vai para meu Deus pela alegria da sua companhia constante, pelo amparo e por criar as possibilidades para eu alcançar as graças que tanto almejo.

À minha orientadora Dra. Valesca Barreto Luz. Obrigada pela oportunidade que me foi dada quando aceitou ser minha orientadora. Por conceder o seu tempo com contribuições e sugestões no desenvolvimento desta pesquisa, me desafiando e me incentivando. Foi um tempo de muita aprendizagem!

À minha coorientadora Dra. Camila Calado de Vasconcelos. Com toda essa boa vontade e criatividade. Suas ideias e seu incentivo foram muito importantes! E por cada voto de confiança em mim depositado. Ficam registrados aqui minha grande admiração e agradecimento.

Ao Dr. Rodrigo Antônio Torres Matos. Obrigada pela oportunidade por me acompanhar em todas as etapas necessárias para realizar esta pesquisa e por todo o ensinamento compartilhado.

Agradeço à Banca Examinadora, por aceitar o convite com prontidão e pelos ensinamentos compartilhados.

Aos meus colegas de Mestrado. Obrigada por dividirem comigo momentos de estudos e conquistas.

Agradeço ao Centro Universitário - Cesmac e a Universidade Estadual do Ceará Faculdade de Veterinária pela oportunidade de mais uma grande conquista profissional.

Aos meus grandes colaboradores: Gilsan Aparecida de Oliveira, João Geraldo Lima, Felipe Paiva, Jonathan Augusto da Silva, Karoline Mércia Lopes Castanha de Souza, Priscilla Manzini de Carvalho e Márcio Calixto. Obrigada por tudo, pelo acolhimento, carinho, paciência e eficiência, quando tudo era novo. Vocês foram essenciais!

Aos meus pais, Maria Belarmino e Manoel Fernandes, por serem bons exemplos, por serem meu esteio, minha proteção, por serem meus grandes e verdadeiros amigos.

Ao meu filho Luiz Eduardo Lopes, pela oportunidade de experimentar o mais profundo amor e por ressaltar, a minha força para ultrapassar obstáculos. Obrigada por sempre me apoiar.

A minha irmã, Emanoele Santos por seu apoio, carinho e amor. As contribuições nem sempre são diretas. Às vezes, basta uma palavra de apoio ou um gesto de gentileza para nos impulsionar. A todos que contribuíram de forma direta ou indireta, meu muito OBRIGADA!

“Tudo tem seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito debaixo do céu.”

(Eclesiastes 3:1)

RESUMO

As espécies de *Candida* são consideradas patógenos oportunistas, entretanto, esses microrganismos são encontrados normalmente no corpo humano. A capacidade patogênica de *Candida* sp. está relacionada a uma combinação de fatores que potencializam sua virulência, dentre estes, destaca-se: a produção de enzimas hidrolíticas extracelulares, que auxiliam em seu processo de invasão tecidual e as condições do sistema imune definem se o fungo se expressa como comensal ou como patogênico. O diagnóstico clínico e laboratorial é importante para o tratamento adequado e exige a realização de procedimentos padronizados. Apesar disso, ainda é um processo lento, levando entre 5 e 7 dias para crescimento do microrganismo. Estudos relataram que o protocolo padrão indica o uso do meio de cultura Sabouraud para isolamento de *Candida* sp. Nesta perspectiva, esse estudo propõe avaliar o tempo de isolamento e crescimento da *Candida albicans* em um meio de cultura enriquecido com a adição de água de coco em pó (ACP), uma vez que ela se destaca por sua rica composição em nutrientes, o que poderia melhorar o crescimento de *C. albicans* em relação ao meio padrão, reduzindo, desse modo, o tempo de diagnóstico. O meio Ágar Sabouraud foi preparado de acordo com as instruções do fabricante. Para o preparo do meio de cultura contendo ACP, foram pesadas 7,5g de ágar (Kasvi, Itália), para 200ml de água destilada, após o preparo da base foram adicionados 18g de água de coco em pó, ambos os meios foram autoclavados. Em seguida foi realizada uma diluição seriada até 10^{-6} , logo depois realizou um plaqueamento de superfície em tanto para o meio convencional (Sabouraud), quanto para o meio proposto. Os resultados demonstraram que o meio no ágar com ACP apresenta maior contagem de leveduras (UFC/mL) em relação meio convencional em menor intervalo de tempo, uma vez que a água de coco em pó (ACP) potencializou o crescimento da cepa de *C. albicans*. Foi observado o potencial de isolamento da *C. albicans* no meio proposto, destacando o expressivo resultado apresentado em relação ao meio de cultura convencional. Representando assim uma possível aplicação desse produto na prevenção adequada para que se possa facilitar o diagnóstico e otimizar a terapia.

Palavras-chave: Diagnóstico clínico. Fungo oportunista. Crescimento celular.

ABSTRACT

Candida species are considered opportunistic pathogens; however, these microorganisms are normally found in the human body. The pathogenicity of *Candida* sp. is related to a combination of factors that enhance its virulence, among which are: the production of extracellular hydrolytic enzymes, which assist in its tissue invasion process and the conditions of the immune system define whether the fungus is expressed as commensal or pathogenic. Clinical and laboratory diagnosis is important for proper treatment and requires standardized procedures. Despite this, it is still a slow process, taking between 5 and 7 days for growth of the microorganism. Studies have reported that the standard protocol indicates the use of Sabouraud culture medium for isolation of *Candida* sp. In this perspective, this study proposes to evaluate the isolation and growth time of *Candida albicans* in a culture medium enriched with the addition of powdered coconut water (ACP), since it stands out for its rich composition in nutrients, which could improve the growth of *C. albicans* compared to the standard medium, thus reducing the diagnosis time. Sabouraud Agar medium was prepared according to the manufacturer's instructions. To prepare the culture medium containing ACP, 7.5g of agar (Kasvi, Italy) were weighed into 200ml of distilled water, after preparing the base 18g of coconut water powder was added, both media were autoclaved. Next, a serial dilution up to 10^{-6} was performed, and then a surface plating was done in both conventional medium (Sabouraud) and the proposed medium. The results showed that the medium on agar with ACP presents a higher yeast count (CFU/mL) compared to conventional medium in a shorter time interval, since the coconut water powder (ACP) potentiated the growth of the *C. albicans* strain. The potential for isolation of *C. albicans* in the proposed medium was observed, highlighting the significant result presented in relation to the conventional culture medium. Thus, it represents a possible application of this product in adequate prevention to facilitate diagnosis and optimize therapy.

Keywords: Clinical diagnosis. Opportunistic fungus. Cell growth.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1	Gênero Candida	13
2.2	Candida albicans	14
2.3	Infecções por <i>Candida albicans</i>	16
2.4	Diagnóstico laboratorial para Candida	17
2.4.1	Meios de cultura para isolamento de Candida	18
2.5	Aplicações tecnológicas da Água de coco de pó – ACP	19
3	MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1	Tipo de estudo	26
3.2	Local da pesquisa	26
3.3	Origem das amostras	26
3.4	Procedimentos	26
3.4.1	Preparação dos meios de cultura.....	26
3.4.2	Controle de qualidade	27
3.4.3	Cultivo da cepa	27
3.4.4	Análise estatística	28
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5	CONCLUSÃO	33
6	PERSPECTIVA	34
	REFERÊNCIAS	35
	APÊNDICE A – ARTIGO SUBMETIDO A REVISTA DE CIÊNCIAS MÉDICAS E BIOLÓGICAS (<i>JOURNAL OF MEDICAL AND BIOLOGICAL SCIENCES</i>)	40

1 INTRODUÇÃO

As leveduras do gênero *Candida* caracterizam-se por serem seres unicelulares, eucarióticos, heterotróficos e que possuem o glicogênio como substância de reserva energética (VIANI, 2007). Leveduras deste gênero possuem distribuição universal, sendo encontradas em diversos ambientes; com o corpo humano elas mantêm uma relação de comensalismo, fazendo, deste modo, parte da microbiota humana e não causando prejuízos, quando em condições de normalidade fisiológica (RODRIGUES, 2008).

Assim como as outras espécies do gênero *Candida*, a *Candida albicans* pode causar graves infecções em pacientes imunocomprometidos e em outras situações hospitalares que causem dano ao sistema imunológico. A *C. albicans* tornou-se um patógeno humano de grande relevância clínica, dado que está associado a altos níveis de morbidade e mortalidade resultantes de infecções em pacientes hospitalizados.

São conhecidas cerca de dezessete espécies de *Candida* de interesse clínico (BARBEDO; SGARBI, 2010) e as infecções da corrente sanguínea por *Candida* são uma preocupação particular para pacientes imunocomprometidos, pacientes em ambientes de terapia intensiva, pacientes com cateteres centrais e pacientes que apresentam nutrição parenteral e/ou antibióticos de amplo espectro por tempo prolongado. As espécies de *Candida* são determinadas em até 15% das espécies nosocomiais da corrente sanguínea e estão associadas a uma taxa de mortalidade de 5% a 71%.

Candida é a principal causa de infecção fúngica com espectro de gravidade que pode variar de infecção mucocutânea à infecção com risco de vida. Fatores de risco relacionados ao desenvolvimento desta infecção são: uso de antibiótico de amplo espectro, uso de cateter venoso central, nutrição parenteral, diálise, neutropenia, doença hematológica maligna, cirurgia gastrointestinal, idosos, prematuros, presença de dispositivos implantáveis e uso de imunossupressores. Internamento em UTI permite a transmissão de espécies de *Candida* e é um fator de risco adicional independente (SIMOES, 2005).

A capacidade patogênica das *Candida* está relacionada a uma combinação de fatores que potencializam sua virulência. Dentre estes, destaca-se a produção de enzimas hidrolíticas extracelulares, que auxiliam em seu processo de invasão tecidual. Um estudo recente relatou um aumento de candidemia de 50% entre 2000 a 2005 e

demostrou que a *Candida albicans* continua sendo a principal causa de infecções da corrente sanguínea em ambientes hospitalares (SOARES, OLIVEIRA & CARNEIRA, 2013). Nesse contexto, as infecções por *Candida albicans* tem gerado grande interesse entre pesquisadores, dado seu grande potencial patogênico, principalmente em ambientes hospitalares. Em virtude disso, tornou-se indispensável a implementação de protocolos padrão para identificação de patogênicos fúngicos e especialmente de *C. albicans* (SILVA, 2017).

Um estudo relatou que o protocolo indica o uso do meio de cultura Sabouraud como padrão ouro para isolamento de *Candida* e a partir de uma identificação morfológica, o isolado é transferido para o meio CHROMagar *Candida* para determinação da espécie. Tal procedimento, apesar de sua eficiência torna-se bastante oneroso quanto ao tempo e o custo para determinação das espécies (ARRAM, 2008).

Desta forma, verificou-se a necessidade de desenvolver um meio mais seletivo e rápido para isolamento de *C. albicans*. Nesta perspectiva o presente estudo visa avaliar o tempo de isolamento e crescimento da *Candida albicans* em um meio de cultura enriquecido com a adição de água de coco em pó (ACP).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Gênero *Candida*

O gênero *Candida* pertence ao Reino Fungi, grupo Eumycota, Filo Ascomycota, Classe Saccharomycetes, Ordem Saccharomycetales, Família Saccharomycetaceae (BARBEDO; SGARBI, 2010). Sua reprodução, normalmente, ocorre por brotamento unipolar (Figura 1). Algumas espécies têm a propriedade de formar estruturas filamentosas, como hifas e pseudohifas, sendo esta característica um obstáculo à fagocitose, principal mecanismo de defesa contra as infecções (VIANI, 2007).

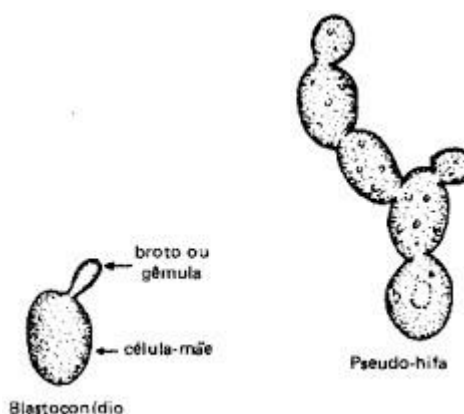


Figura.1: Blastoconídeo em brotamento e pseudo-hifa.

(Fonte: <http://www.enq.ufsc.br/>)

De um modo geral, essas leveduras possuem distribuição universal, podendo ser encontradas nos seres humanos ou animais, solos, água, vegetais, alimentos. Especificamente, nos seres humanos estes microrganismos fazem parte também da microbiota normal do intestino, trato genital, mucosa bucal, orofaringe, dobras da pele, permanecendo nestes locais como colonizantes (RODRIGUES, 2008).

As leveduras do gênero *Candida* têm grande importância pela alta frequência com que colonizam e infectam o hospedeiro humano. Espécies de *Candida* são encontradas no tubo gastrointestinal em 20 a 80% da população adulta saudável. Entre as mulheres, cerca de 20 a 30% apresentam colonização por *Candida* na vagina. Dessa forma, as leveduras estão bem adaptadas ao corpo humano, colonizando-o sem produzir sinais de doença em condições de normalidade fisiológica (RODRIGUES, 2008).

Porém, quando alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro ou quando ocorre comprometimento de barreiras anatômicas, tais como, queimaduras ou

procedimentos cirúrgicos, estes microrganismos comensais multiplicam-se excessivamente, expõem seus fatores de virulência e invadem a mucosa causando doença, sendo considerados, dessa maneira, patógenos oportunistas (CAMARGO; ALVES; PARLOW; GOULART, 2008).

Em hospitais terciários, o gênero *Candida* responde por cerca de 80% das infecções fúngicas documentadas, representando um grande desafio aos clínicos de diferentes especialidades devido às dificuldades diagnósticas e terapêuticas das infecções causadas por tais agentes (COLOMBO; GUIMARÃES, 2007).

2.2 *Candida albicans*

Em 1963, eram conhecidas apenas cinco espécies de *Candida* relacionadas a doenças em humanos, incluindo: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* e *C. krusei* (RUIZ; SUGIZAKI; MONTELLI, et al., 2005). Atualmente, são conhecidas cerca de dezessete espécies de interesse clínico. Além dessas já citadas, são mencionadas na literatura *C. glabrata*, *C. kefir*, *C. lusitanae*, *C. dubliniensis*, *C. rugosa* e *C. famata*, dentre outras (BARBEDO; SGARBI, 2010). Entre as espécies do gênero *Candida*, a *Candida albicans* continua sendo a principal causa de infecções da corrente sanguínea em ambientes hospitalares (SOARES, OLIVEIRA e CARNEIRA, 2013).

Sem dúvida, *Candida albicans* é a espécie mais frequente descrita em casos de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde (IRAS) em todas as partes do mundo (FRANÇA, 2006; PFALLER; DIEKEMA, 2007). Desta forma, o fungo tem a capacidade de se adaptar a diferentes nichos biológicos. As leveduras do gênero *Candida*, em particular *C. albicans* são patógenos oportunistas (MENEZES, MENDES e CUNHA, 2009; DIGNANI, SOLOMKIN E ANAÏSSIE, 2003).

É a espécie de *Candida* com maior potencial patogênico, devido à diversidade de fatores de virulência descobertos. Foi o primeiro fungo zoopatogênico que teve o seu genoma sequenciado (organismo diplóide com oito pares de cromossomos), o que possibilita uma variedade de experimentos e, por conseguinte, um grande avanço na biologia deste fungo, principalmente na expressão dos genes (BARBEDO; SGARBI, 2010).

A *Candida albicans* tem uma ocorrência também é alta em crianças e recém-nascidos prematuros internados em UTIs (FRANÇA, 2006). É a espécie mais frequente em infecções de corrente sanguínea (RUIZ, 2005), sobretudo em neonatos,

pacientes transplantados, associadas a cateteres, e pacientes que recebem nutrição parenteral e prévia terapia antifúngica (BARBEDO; SGARBI, 2010). Está associada a quadros de septicemia e promove aderência a materiais inertes produzindo biofilme (VIANI, 2007).

O processo inicial de virulência de *C. albicans* é a sua adesão às células do hospedeiro. Essa ação é de fundamental importância para que o fungo sobreviva aderido ou internalizado pelas células epiteliais. A aderência pode ser mediada por uma variedade de proteínas expressa na superfície do patógeno e envolve uma família de genes, Agglutinin-Like Sequence (ALS) que codificam oito destas proteínas (ZHAO et al., 2004). A expressão das adesinas é ocasionada por condições ambientais ou fisiológicas encontradas no hospedeiro (ÁLVARES; SVLDZLNSKI; CONSOLARO, 2007).

As condições do sistema imune definem se o fungo se expressa como comensal ou como patogênico. Porém, como aponta Rossi e colaboradores (2011):

[...] fatores de virulência expressados por *C. albicans*, tais como adesinas, mudança fenotípica, comportamento dimórfico, e secreção de enzimas hidrolíticas, podem contribuir para a persistência da colonização assim como o desenvolvimento de episódios sintomáticos (Rossi et al. 2011).

A *C. albicans* expressa fatores de virulência tais como: adesividade, alterações fenotípicas e morfológicas que resultam no sucesso do processo infeccioso (CALDERONE; FONZI, 2001). Entre outros fatores envolvidos na transição da forma comensal para patogênica destacam-se a proteção contra lise osmótica (parede celular); liberação de proteases que facilitam que *C. albicans* atravesse o epitélio do hospedeiro; formação de hifas para aumentar a capacidade nutricional e fixação ao tecido (CULTLER, 1991).

A habilidade em produzir enzimas hidrolíticas é considerado importante fator patogênico. As principais enzimas consideradas como fatores de virulência, produzidas por leveduras do gênero *Candida*, são as proteinases, que hidrolisam ligações peptídicas, e as fosfolipases, que hidrolisam os fosfoglicerídeos. Foi sugerido que esta propriedade poderia ser usada como um critério para a biotipagem de *C. albicans* CANDIDO et al. (2000).

2.3 Infecções por *Candida albicans*

Nas últimas décadas, a *Candida spp.* vem se tornando um importante agente causador de infecções. Os procedimentos médicos invasivos, doenças e medicamentos que comprometem o sistema imune e o fenômeno da resistência contribuem de forma decisiva para esse quadro (GOMES *et al.*, 2010). Há variações geográficas significativas no padrão etiológico de infecções invasivas por *Candida spp.* documentadas em diferentes países. Enquanto na América do Norte nota-se o predomínio de *C. glabrata* entre as espécies não *albicans*, na América do Sul, observa-se predomínio de *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* (KLOTZ *et al.*, 2007).

Infecções por *Candida* envolvem um espectro amplo de doenças superficiais e invasivas, acometendo pacientes expostos a uma grande diversidade de fatores de risco. Infecções de pele e mucosas podem ser documentadas em pacientes saudáveis, mas com pequenas alterações locais de resposta do hospedeiro no sítio da infecção por *Candida*, a exemplo de mulheres que desenvolvem candidíase vaginal. Já foram identificadas várias cepas de *Candida sp.* COLOMBO; GUIMARÃES, (2003).

Por outro lado, infecções sistêmicas por *Candida* podem comprometer órgãos decorrente de disseminação hematogênica da levedura pelo organismo, complicações infecciosas estas geralmente documentadas em pacientes críticos, portadores de doenças degenerativas e/ou neoplásicas SILVA *et al.* (2016). Dos fungos do gênero *Candida spp.*, a espécie *Candida albicans* é a mais prevalente na cavidade oral e a mais patogênica. Há consenso na literatura que a *Candida albicans* é o agente etiológico mais comum das vaginites micóticas, ocorrendo em 80 a 95% dos casos (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

Alterações dos mecanismos de defesa do hospedeiro podem ser decorrentes de mudanças fisiológicas características da infância (prematuridade) e envelhecimento ou mais frequentemente, associadas a doenças degenerativas, neoplásicas, imunodeficiências congênitas ou adquiridas e imunodepressão induzida por atos médicos (SILVA *et al.*, 2016).

Entre os principais fatores de virulência das espécies de *Candida* podem ser citados: a capacidade de crescer a 37°C; variabilidade fenotípica, pleomorfismo, cujo papel é importante nos processos iniciais de invasão tecidual (SIDRIM & ROCHA, 2004), a formação de hifas e pseudo-hifas, as quais representam um obstáculo para a fagocitose e permitem a fixação da levedura nos epitélios; a produção de fosfolipases e de proteinases que auxiliam na aderência da levedura à mucosa do hospedeiro e

também facilitam a invasão fúngica; as mananas que promovem a depressão da imunidade (MEDRANO, 2004).

No Brasil, estudo realizado por Colombo e Guimaraes (2007) em seis hospitais terciários do Rio de Janeiro e São Paulo, envolvendo 145 episódios de candidemia, mostrou que as espécies mais frequentemente isoladas foram *C. albicans* (37%), *C. parapsilosis* (25%), *C. tropicalis* (24%), *C. rugosa* (5%) e *C. glabrata* (4%) (KLOTZ et al, 2007). Estes dados foram confirmados por casuística de outros autores que mostraram a relevância de infecções invasivas por *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* no nosso meio (COLOMBO; GUIMARÃES, 2007).

A candidíase vaginal (CV) continua sendo extremamente comum, uma vez que quase todas as mulheres experimentam esse desagradável quadro genital pelo menos uma vez em algum momento de suas vidas (ROSA e RUMEL, 2004).

A grande maioria das cepas isoladas da vagina correspondem a espécies da *C. albicans*, estimando-se que a proporção de infecções por cepas *nãoalbicans* venha aumentando progressivamente nos últimos anos (SIMÕES, 2005).

Clinicamente ambas são indistinguíveis, causando sintomatologia muito semelhante. Todavia, tem sido relatado que a *C. albicans* está mais associada com os sintomas do que as cepas *não-albicans*, as quais geralmente são mais resistentes às terapias habituais. Estes microrganismos comensais tornam-se patogênicos caso ocorram alterações nos mecanismos de defesa do hospedeiro ou o comprometimento de barreiras anatômicas secundariamente a queimadura ou procedimentos médicos invasivos (SOARES et al., 2019).

2.4 Diagnóstico laboratorial para Candida

A multiplicação dos fungos e as diferenças em seu comportamento fazem com que alguns sejam facilmente identificáveis nas preparações a fresco, porém, outros requerem o emprego de vários métodos laboratoriais de identificação. A maioria dos procedimentos laboratoriais para identificação do gênero *Candida* sp. consiste na observação das suas características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas (MURRAY et al., 2000). Abaixo temos uma visualização microscópica da *Candida* cultivada (Figura 2 e 3).

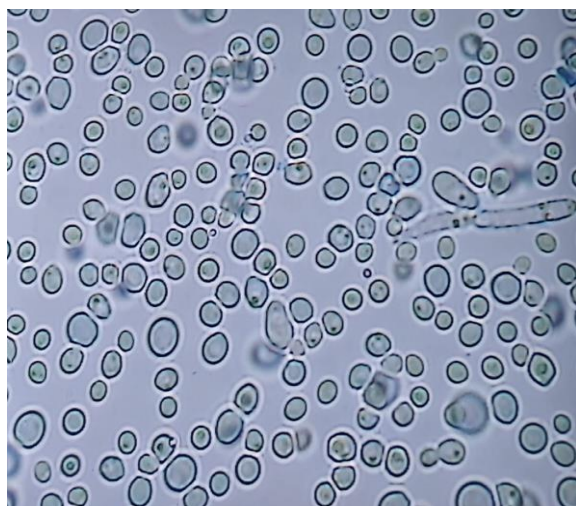


Figura 2: Microscopia de *Candida albicans* em Ágar Água de Coco em Pó (ACP), hifas. apresentando esporos e hifas. (Fonte: Elaborado pelo autor).

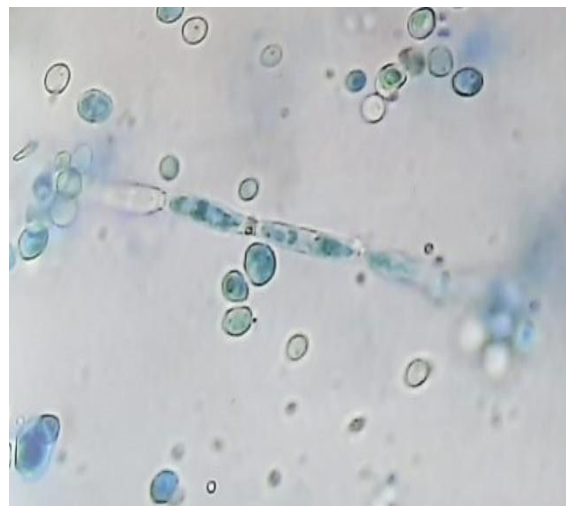


Figura 3: Microscopia de *Candida albicans* em Ágar Sabouraud, apresentando esporos e hifas. (Fonte: Elaborado pelo autor).

2.4.1 Meios de cultura para isolamento de *Candida*

Para o isolamento e identificação dessa levedura, os meios devem possuir substâncias essenciais para sua reprodução e garantir seu crescimento, tais como: Ágar Sabouraud com cloranfenicol e CHROMagar *Candida* (FERREIRA, 2011)

2.4.1.1 Agar Sabouraud Dextrose (SDA)

O meio Agar Sabouraud Dextrose apresenta um pH levemente ácido de 5,8 e alta tensão osmótica pelo teor de glicose que é seletivo para fungo, porém, não inibe a crescimento de bactéria. Mas inibe o crescimento de algumas bactérias Grampositivas e Gram-negativas. A seletividade desse meio é conseguida por meio da adição de cloranfenicol (0,2 mg/mL) um antibiótico de amplo espectro, que consegue ser autoclavado (Manual BD, 2003).

Portanto, é um meio de cultura não seletivo e sim qualitativo usado como método convencional, para cultura e manutenção de fungos patogênicos e não patogênicos, especialmente dermatófitos. Além da *C. albicans*, favorece o crescimento de *Trichophyton rubrum*, *Sporothrix schencki* (Manual BD, 2003).

2.4.1.2 CHROMagar *Candida*

CHROMagar é um meio de isolamento e identificação para *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. dubliniensis*. Inibe o crescimento bacteriano e pode ser utilizado como meio de isolamento seletivo para outras espécies de leveduras e para fungos filamentosos (BD, 2014).

A mistura exclusiva de cromogênios é composta por substratos artificiais (cromogênios), que libertam compostos de várias cores na sequência da degradação de enzimas específicas, o que permite a diferenciação de determinadas espécies, ou a detecção de determinados grupos de organismos, utilizando apenas um número mínimo de testes de confirmação. O cloranfenicol inibe a maioria dos contaminantes bacterianos (Manual BD, 2014).

2.5 Aplicações tecnológicas da Água de coco de pó – ACP

Em termos nutricionais, a água de coco se destaca por sua rica composição em nutrientes. Quando o coco está maduro, a glicose e frutose se combinam para formar a sacarose (CARVALHO et al., 2006). Além de açúcares, a água de coco possui proteínas, vitaminas como ácido ascórbico, ácido nicotínico, biotina, riboflavina e ácido fólico, sais minerais tais como: Na^+ , Ca^{2+} , Fe^{3+} , K^+ , Mg^{2+} e PO_4^{3-} (RICHTER et al., 2005) e antioxidantes (FONSECA et al., 2009).

A água de coco em pó (ACP) foi desenvolvida com intuito de tornar mais simples a utilização da água de coco. (SALGUEIRO et al, 2002). Os primeiros resultados obtidos com a água de coco *in natura* levaram os pesquisadores a aprofundarem os estudos no sentido de padronizá-la e estabilizá-la na forma de pó (ACP), para que a mesma, não perdendo suas características físico-químicas, tivesse seu uso simplificado, podendo representar uma alternativa para a difusão de várias biotecnologias, fato alcançado no início de 2002 SALGUEIRO; NUNES (2012).

Em virtude da presença de açúcares, ela foi testada na área biotecnológica como meio de cultivo *in vitro* para embriões de *Jatropha curcas* L. (pinhão-manso). Sua presença proporcionou um melhor crescimento das plântulas NUNES *et al.* (2008).

Uma investigação científica foi realizada para o delineamento da atual acerca do desenvolvimento da pesquisa Efeito da adição de água de coco em pó no enriquecimento de meio de cultura para detecção de *Candida albicans* na base de dados do Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), e World Intellectual Property Organization (WIPO-PATENTSCOPE), Google Patents utilizando como descritores as seguintes palavras: Meios de cultura alternativos, *Candida albicans*, Água de coco em pó, isolamento de fungo e meios de cultura fungos.

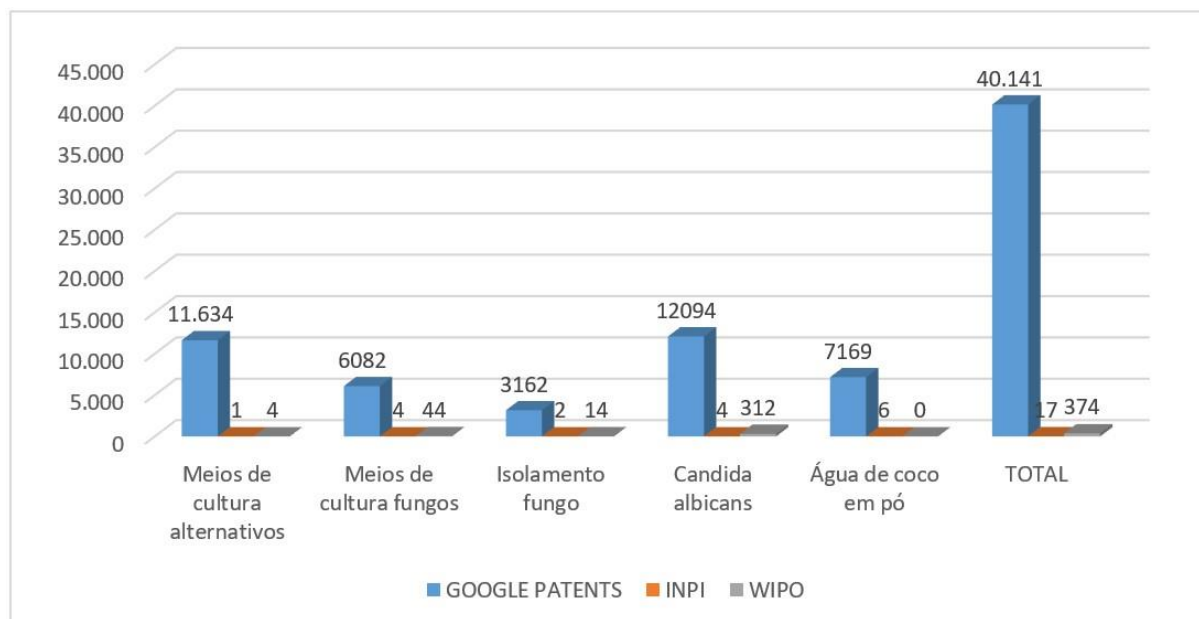
Aplicando os descritores citados acima foi encontrado um total de 17 patentes depositadas no INPI e 374 patentes depositadas no WIPO e 40.141 patentes

depositadas no Google Patents. Porém, todas essas não foram específicas para a pesquisa do Efeito da adição de água de coco em pó no enriquecimento de meio de cultura para detecção de *Candida albicans*. A distribuição das patentes por descritores e base de dados está descrita no quadro 1 e gráfico 1 e os documentos relevantes no âmbito patentário foram descritos abaixo no quadro 2.

Quadro 1 – Distribuição das patentes.

DESCRITORES	GOOGLE PATENTS	INPI	WIPO
Meios de cultura alternativos	11.634	1	4
Meio de cultura fungos	6090	4	44
Isolamento fungo	3162	2	14
<i>Candida albicans</i>	12094	4	312
Água de coco em pó	7169	6	0
Total	40.141	17	374

Fonte: Elaborado pelo autor.

Gráfico 1 – Distribuição de patentes.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Quadro 2 – Caracterização de documentos relevantes no âmbito patentário.

Número de documento	Plataforma	Descrição da Patente
BR102013023075	WIPO	Formulação de meios de cultura alternativos para produção de bioativos.
WO2021007629	WIPO	Método de produção de coquetel enzimático
PI0607164-3	WIPO	Método para a proteção de uma planta.
PT108840	WIPO	Método para produção de micélio de macrofungos através da bioconversão de soro e resíduos de maçã provenientes da indústria de laticínios e da fruta
BR102013010437A2	GOOGLE PATENTS	Meio de cultura de microorganismos à base de melão de cana-de-açúcar.
BR102015019457A2	GOOGLE PATENTS	Desenvolvimento de meio de cultura à base de água de coco em pó no processo de diluição e criopreservação de sêmen humano.
Número de documento	Plataforma	Descrição da Patente

BRPI0406610B1	GOOGLE PATENTS	Meio de cultura seletivo para o isolamento e/ou detecção prematura de espécies do gênero streptococcus
WO2013177647A1	GOOGLE PATENTS	Meio de cultura para bactérias do gênero clostridium livre de componentes de origem animal e processo para produção de sobrenadante contendo uma ou mais proteases com atividade colagenolítica e gelatinolítica.
BR1020130340812A2	INPI	Processo de desenvolvimento de um meio de cultura líquido utilizando polpa de banana pacovi e de cupuaçu desidratadas para produção de biomassa por fungos filamentosos.
PI0305481-0A2	INPI	Meio de cultura para detecção de fungos e leveduras e método para a preparação do meio.
PI0507554-8B1	INPI	Meio de cultura para produção de fungos filamentosos.
PI7702807	INPI	Meio de caldo de cultura para detecção de levedos cândida e de outros fungos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O documento BR102013023075 refere-se formulação de meios de cultura alternativos para produção de bioativos. a presente invenção traz a formulação de um meio de cultura que produz compostos bioativos como: goma xantana biopolímeros ou exopolissacarídeos eps e raminolípídeos utilizando em sua formulação água produzida (efluente da indústria de petróleo), glicerina bruta resíduo da indústria de biocombustíveis e agroindústria e outros nutrientes como: fosfato de potássio, carbonato de amônio, extrato de levedura e glutamato de sódio. empregando os microorganismos xanthomonas canzpeslris, enierobacrer spp. pseudomonas spp. o meio de produção, através do processo de fermentação aeróbica, utilizando os microorganismos, isoladamente e em consórcio, é empregado para produção de biativos para recuperação avançada de petróleo.

O documento WO2021007629 refere-se a um método de produção de coquetel enzimático com atividade de celulase a partir de um meio de cultura aprimorado, que permite a produção no local, além de garantir sustentabilidade e eficiência na produção

enzimática. O método compreende o cultivo de fungo (preferencialmente *Trichoderma reesei*) modificado geneticamente, com pelo menos superexpressão do fator de transcrição *Xyrl*, conforme definido na SEQ ID N. 1, em meio de cultura constituído de levedura e pelo menos uma fonte de carbono. Após determinado tempo de cultivo, o meio de cultura obtido apresenta a atividade enzimática de interesse.

O documento PI0607164-3 refere-se a um método para a proteção de uma planta plantada em um meio de cultura de pragas de insetos foliares, que compreende a aplicação de uma quantidade eficaz como inseticida de uma mistura que compreende metomil e oxamil ao meio de cultura.

O documento PT108840 refere-se a um novo método de produção de micélio de macrofungos que permite o tratamento, valorização e reaproveitamento de resíduos de processamento da indústria de laticínios, e de valorização e reaproveitamento de resíduos de fruta. assim, apresenta-se um meio de cultura inovador para a produção de micélio de macrofungos à base de soro e resíduos de maçã, permitindo o cultivo de diversas espécies do filo basidiomycota e ascomycota. esta invenção demonstra ser possível obter uma produção micelial de elevada qualidade com baixo custo de produção, usando recursos naturais normalmente desperdiçados, permitindo atingir velocidades de crescimento miceliais semelhantes ou superiores aos meios convencionalmente usados. como tal, o método alia a vantagem de valorizar fluxos de massa resultantes destas atividades económicas para produção de um produto com elevado interesse a nível alimentar, medicinal, industrial e biológico.

O documento BR102013010437A2 refere-se a um meio de cultura de micro-organismos à base de melaço de cana-de-açúcar. A presente invenção tem o intuito de sanar algumas demandas levantadas pelos meios de cultura de micro-organismos, propondo: um meio de cultura alternativo de baixo custo à base de melaço de cana-de-açúcar, extrato de levedura e farelo de soja para o cultivo e multiplicação de microorganismos.

O documento BR102015019457A2 refere-se a um meio diluente à base de água de coco em pó (acp-113c) em comparação ao meio convencional padrão ouro no mercado - meio de congelamento, teste de tampão de gema (tyb) e meio preconizado pela oms - gema de ovo-citrato-glicerol (geyc), em protocolo modificado de criopreservação para sêmen humano, proporcionando o uso da água de coco em pó (ACP) ou liofilizada como diluente para a conservação do sêmen humano a fresco, refrigerado ou congelado em programas de reprodução humana assistida.

O documento BRPI0406610B1 refere-se a um Meio de cultura seletivo para isolamento e / ou detecção precoce de espécies de estreptococos. A presente invenção se refere à microbiologia, em particular com um meio de cultura seletivo para o isolamento e / ou detecção precoce de espécies de estreptococos. O meio proposto permite a identificação de espécies de estreptococos pelo aparecimento de 3 tonalidades diferentes nos organismos a serem detectados e pelo aparecimento de emissões fluorescentes e mudanças na cor do meio, o que oferece uma identificação com alto grau de sensibilidade e especificidade. O meio compreende razões específicas de misturas de bases nutritivas ricas em compostos de origem proteica (polipeptídeos, peptídeos, proteoses, aminoácidos) e vitaminas que permitem um crescimento abundante das espécies de interesse, além da inclusão do hidrolisado enzimático do sangue.

O documento WO2013177647A1 refere-se a um meio de cultura para *C. histolyticum*, livre de componentes de origem animal se por compreender peptonas de origem não animal, preferivelmente peptonas vegetais, extrato de levedura e os aminoácidos cisteína e arginina. A presente invenção também se refere a processo para a produção de um sobrenadante de uma cultura líquida de *Clostridium histolyticum* contendo uma ou mais proteases com atividade colagenolítica e gelatinolítica e composição farmacêutica compreendendo como ingrediente ativo o sobrenadante ou o sobrenadante purificado composto.

O documento BR1020130340812A2 refere-se a um processo de desenvolvimento de um meio de cultura complexo formulado com polpa de banana pacovi (*Musa sp.*) e de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) para cultivo, pela tecnologia da fermentação submersa, de fungos filamentosos, e promove a disponibilidade de nutrientes que favorecem o crescimento de três cogumelos comestíveis (*Pleurotus albidus*, *Pleurotus florida* e *Lentinus citrinus*).

O documento PI03054810A2 refere-se a uma composição do meio de cultura para fungos e leveduras, bem como do método de preparação e dos usos da dita composição. A composição do meio de cultura é empregada para a análise de contaminação por microorganismos na indústria de alimentos, preferivelmente na indústria de refrigerantes à base de cola, sendo que a composição compreende entre 4,5 e 5,5% g/1 de fosfato de potássio monobásico, entre 0,5 e 1,5% g/1 de cloreto de amônio, entre 0,5 e 1,5% g/1 de sulfato de magnésio heptaidratado, entre 30,0 e 50,0% g/1 de Sacarose D(+) e água.

O documento PI05075548B1 refere-se um meio de cultura para fungos filamentosos compreendendo pelo menos uma fonte de carbono escolhida do grupo consistindo em melaço, extrato de malte e sacarose e pelo menos uma fonte de nitrogênio orgânico escolhida de extrato de levedura e milhocina; é também descrito um método para a produção de fungos filamentosos, em particular fungos nematófagos, em escala industrial, compreendendo a etapa de semeadura de conídios de tais fungos no meio de cultura mencionado acima e mantendo tal meio de cultura a uma temperatura de 23-30 °C por um tempo de 5-10 dias para se obter a reprodução e crescimento dos fungos.

O documento PI77028074 refere-se a uma composição para análise microbiana e particularmente a um meio para detecção de levedos de cândida e outros fungos em amostras de urina.

Com a prospecção científica no âmbito patentário, pôde-se constatar que não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo a presente invenção, de forma que o meio proposto para Candida é inédito.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Tipo de estudo

O estudo possui caráter qualitativo e quantitativo por se tratar de um estudo com cepa fúngica padrão, o presente estudo não necessitou de apreciação do Comitê de ética.

3.2 Local da pesquisa

Este trabalho foi desenvolvido, nos laboratórios do *Stricto Sensu* Professora Enaura Quixabeiras - Campus I do Centro Universitário Cesmac.

3.3 Origem das amostras

A cepa padrão do fungo utilizada no trabalho foi proveniente da micoteca da UFPE/URM *Candida albicans* URM5689, meios de cultura cedidos pelo Centro Universitário – Cesmac e Água de coco em pó – ACP-326 cedida pela Startup ACP Biotecnologia da Universidade Estadual do Ceará.

3.4 Procedimentos

3.4.1 Preparação dos meios de cultura

Dos meios de cultura indicados na Figura 4, o meio Agar Sabouraud foi preparado de acordo com as instruções do fabricante.



Figura 4: Meios de cultura utilizados (Fonte: Elaborado pelo autor).

Para o preparo do meio de cultura contendo ACP, foram pesadas 7,5g de ágar (Kasvi, Itália), adicionados 200ml de água destilada. Após a pesagem, hidratouse o mesmo com uma pequena quantidade de água destilada, até torná-lo úmido, em seguida, acrescentou-se o restante da água com o auxílio de uma proveta e um bastão

de vidro. Após o preparo da base, foi acrescentada 18g de água de coco em pó, conforme indicado (Na Figura 5). Após homogeneização, o pH determinado e corrigido, uma vez que os fungos se desenvolvem melhor em pH levemente ácido (pH 5.5) a solução foi transferida para um Erlenmeyer e esterilizada em autoclave a 121°C/15 min, sendo os meios distribuídos em placas de Petri descartáveis e estéreis, próximo ao bico de Bunsen.



Figura 5: Adição da água de coco em pó (Fonte: Elaborado pelo autor).

3.4.2 Controle de qualidade

Para o controle de qualidade, 10% dos meios confeccionados foram incubados em estufa bacteriológica a $36^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas para o controle de esterilidade. Todos os meios confeccionados foram devidamente identificados com o nome, data de fabricação, data de validade e tipo de armazenamento e embalados em filme plástico PVC transparente para evitar o ressecamento. Após 24 horas, os meios preparados não sofreram alterações em seu aspecto e não foi observado crescimento de qualquer colônia ou contaminação.

3.4.3 Cultivo da cepa

Previamente ao cultivo foi preparada uma suspensão de 1 ml *Candida albicans* URM5689 com 0,1 mL com uma alça calibrada e transferida para um tubo de cultura com 9 ml de solução salina de 0,9% esterilizada (10^{-1}) que foi homogeneizada em agitador de tubos. Em seguida, realizou-se uma diluição seriada até se atingir a diluição 10^{-6} .

Após as diluições, foi realizada a semeadura em placas de Petri contendo o meio de cultura, pipetando 0,1 ml de cada diluição e espalhando o inóculo com auxílio da

alça de Drigalsky (Figura 6). Em seguida, cada diluição das amostras foi semeada em triplicata e incubou-se a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 5 dias.

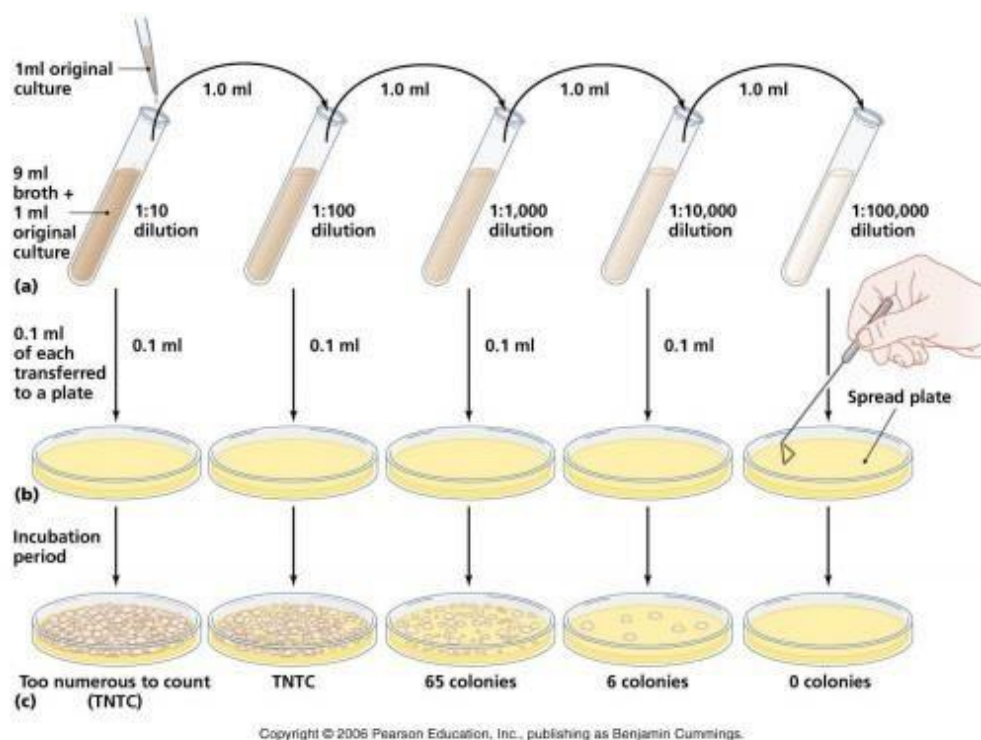


Figura 6: Procedimento de diluição seriada (Fonte: Pearson Education, 2006).

A avaliação do crescimento foi determinada por contagem em placas do número de células viáveis (UFC/mL). Após o crescimento, foi feita a contagem de unidades formadoras de colônias nos dois meios. A contagem de cada placa foi realizada para estimar o número de colônias, identificando as placas que apresentaram de 10 a 150 colônias e o cálculo da média da unidade formadora de colônia (UFC) conforme descrito por Vieira e Fernandes, 2012.

3.4.4 Análise estatística

Para avaliar a normalidade foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov, em seguida foi utilizado uma análise de variância (Two-Way ANOVA) para comparar os meios de cultura e as concentrações estudadas, posteriormente foi realizada uma análise de medidas repetidas no tempo comparando a quantidade de colônias durante os períodos observados. As médias foram comparadas através do teste de Tukey assumindo 5% de significância. Todos os dados foram analisados através do software RStudio v1.4.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir de diluição em série foi possível destacar crescimento elevado da *Candida albicans*, demonstrando a diferença entre o meio ágar ACP e o meio Sabouraud neste estudo. Verificou-se que na diluição de 10^{-1} nos tempos de incubação de 18, 24 e 48 horas, não foi possível observar diferenças significativas na quantidade de UFC/mL quando observados os meios de forma individual, bem como quando comparados entre si ($p > 0,05$). Na diluição de 10^{-2} , quando observado apenas o meio proposto (Ágar ACP), não houve diferença significativa, sendo que a quantidade de colônias foi igual ou superior a 3.000 UFC/mL em todos os tempos de incubação (Tabela 1).

Tabela 1 – Valores médios de colônias da cepa de *Candida albicans* em relação meio de cultura Sabouraud e Ágar ACP, diluição e tempo de incubação.

Diluições	Tempos de incubação de <i>C. albicans</i> nos meios de cultura					
	18 horas		24 horas		48 horas	
	Ágar ACP	Ágar Sabouraud	Ágar ACP	Ágar Sabouraud	Ágar ACP	Ágar Sabouraud
10^{-1}	$\geq 3.000 \pm 0^a$	$\geq 3.000 \pm 0^a$	$\geq 3.000 \pm 0^a$	$\geq 3.000 \pm 0^a$	$\geq 3.000 \pm 0^a$	$\geq 3.000 \pm 0^a$
10^{-2}	$\geq 3.000 \pm 0^{a*}$	$43,33 \pm 6,66^{Bb^*}$	$\geq 3.000 \pm 0^a$	$\geq 3.000 \pm 0^{Aa}$	$\geq 3.000 \pm 0^a$	$\geq 3.000 \pm 0^{Aa}$
10^{-3}	$55,33 \pm 2,90^{Bb^*}$	$19,00 \pm 3,78^{Bc^*}$	$\geq 3.000 \pm 0^{Aa^*}$	$21,66 \pm 10,40^{Bb^*}$	$\geq 3.000 \pm 0^{Aa}$	$\geq 3.000 \pm 0^{Aa}$
10^{-4}	0^{Bc}	0^{Bd}	$14,33 \pm 3,92^{ABb}$	$8,33 \pm 1,20^{Ab}$	$17,66 \pm 5,36^{Ab}$	$11,00 \pm 2,08^{Abc}$
10^{-5}	0^{Bc}	0^{Bd}	$9,00 \pm 1,73^{Ab}$	$6,33 \pm 0,88^{Ab}$	$12,66 \pm 1,76^{Ab^*}$	0^{Bc^*}
10^{-6}	0^c	0^d	0^c	0^c	0^c	0^c

Legenda: ACP: água de coco em pó; Letras maiúsculas diferentes na mesma linha representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os períodos avaliados para o cada meio e cultura; Letras minúsculas diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as diluições. Asteriscos (*) na mesma linha representa diferença significativa ($p < 0,05$) entre as os meios de cultura em cada período. Fonte: Elaborado pelo autor.

No Ágar Sabouraud Dextrose (SDA), houve um crescimento maior de UFC/mL nos tempos de 24 e 48 horas quando comparado ao tempo de 18 horas, havendo diferença estatisticamente significativa. Também foi possível observar uma diferença significativa na quantidade de UFC/mL entre os meios no tempo de 18 horas ($p < 0,05$). Quando observado apenas o meio proposto (Ágar ACP), a quantidade de colônias foi igual ou superior a 3.000 UFC/mL em todos os tempos de incubação.

Na diluição de 10^{-3} , quando observado apenas o Ágar ACP, não houve diferença significativa ($p>0,05$). Entre os tempos de incubação de 24 e 48 horas, porém, nestes dois tempos de incubação, a contagem de UFC/mL foi significativamente superior ao verificado no tempo de 18 horas ($p<0,05$). No SDA houve uma diferença significativa na contagem de UFC/mL entre os tempos de incubação, sendo observado uma maior quantidade UFC/mL no tempo de 48 horas.

Comparando os meios foi observado um maior número de UFC/mL no Ágar ACP nos tempos de 18 e 24h, não sendo observada diferença significativa no tempo de 48 horas. Conforme ilustrado na figura 5 ilustra a nível macroscópico da quantidade de UFC/mL observada na diluição de 10^{-3} no período de incubação de 24 horas.

Nas diluições de 10^{-4} e 10^{-5} no meio ágar ACP houve diferença significativa crescente de UFC/mL entre os tempos de incubação. Avaliando o SDA na diluição de 10^{-4} houve diferença significativa crescente de UFC/mL entre os tempos de incubação, enquanto, na diluição 10^{-5} houve uma maior quantidade de UFC/mL apenas no tempo de 24 horas quando comparados aos demais tempos de incubação. Comparando os meios nas diluições de 10^{-4} e 10^{-5} foi observado uma maior quantidade de UFC/mL no ágar proposto com 24 e 48 horas de incubação.

A cepa de *Candida albicans* estava presente da diluição 10^{-1} a 10^{-5} , mas para o nosso produto não apresentou UFC/mL observadas nas placas 10^{-6} .

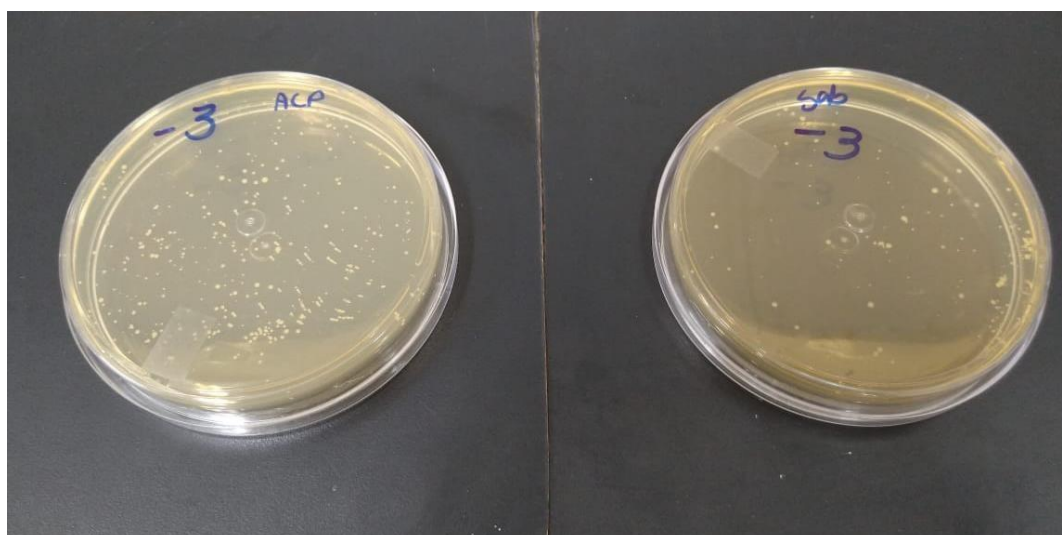


Figura 5: Placas na diluição 10^{-3} após 24 horas. À esquerda, meio proposto. À direita, meio convencional. Fonte: Elaborado pelo autor.

De acordo com Farah,2010 os testes microbiológicos, utilizando o meio ágar Sabouraud Dextrose (SBD), são os de escolha para o isolamento de leveduras do

gênero *Candida*, especialmente oriundas de culturas mistas pela facilidade de manejo, custo e resultados. Quando adicionado de cloranfenicol torna-se mais seletivo, pela capacidade de inibir o crescimento da maioria de espécies bacterianas. Os dois meios de cultura foram eficientes para o desenvolvimento da cepa de *C. albicans*, contudo observou-se maior número de UFC/mL no meio proposto com ACP em relação meio convencional Sabouraud, em virtude do alto teor de glicose, proteínas e um pH mais ácido encontrado na água de coco em pó.

As espécies do gênero *Candida*, geralmente, se desenvolvem bem em meios de cultura de composição relativamente simples como o Sabouraud Dextrose, desenvolvendo colônias com aspecto característico na sua maioria com colônias glabras, de coloração branca ou bege, textura cremosa e superfície lisa (LACAZ et al.2002). O estudo demonstrou crescimento com colônias características com coloração branco amarelada, porém a adição da água de coco de em pó – ACP 326 potencializou o crescimento de colônia, devido aos nutrientes encontrados na água de coco sais minerais tais como: Na^+ , Ca^{2+} , Fe^{3+} , K^+ , Mg^{2+} e PO_4^{3-} .

Em pesquisas realizadas por Marques e Silva (1981) foram comparados os crescimentos de cultivos de diversos cogumelos em ágar de água-de-coco, como aquele observado nos meios Sabouraud e Sabhi, a fim de testar sua eficiência, verificando-se que o ágar de água-de-coco se comporta tão bem quanto os meios avaliados, para evidenciar o início do crescimento de fungos mantidos em laboratório. Os resultados desta pesquisa corroboram com os autores quando se observa a água de coco como meio de cultura mostrou-se eficiente para o crescimento fúngico. Comprovando os resultados desta pesquisa, Câmara e colaboradores (2011), observaram que as características nutricionais da água de coco têm possibilitado seu uso em diversas aplicações biotecnológicas, das quais destacamos: uso da água de coco como meio de enriquecimento para bactérias (ESQUENAZI et al., 2002), diluente de vacinas virais (CARDOSO et al., 2006), meio para fungos (UNAGUL et al., 2007) e implantes dentários (GOPIKRISHNA et al., 2008). Reforçando, o interesse no potencial de utilização que água de coco possui como meio de cultura para desenvolvimento de microrganismos.

O Ágar Sabouraud Dextrose (SDA), denominado simplesmente de Ágar Sabouraud, também apresenta elevadas concentrações de carboidratos e pH 5,6, fatores que favorecem o crescimento de diversos fungos leveduriformes e filamentosos (WINN et al., 2008). Os resultados desta pesquisa apresentam que a água de coco

como meio de cultura revela-se eficiente em virtude das moléculas de açúcares, as vitaminas e os sais minerais presentes na composição da água de coco e o pH.

A suplementação do Sabouraud com antibióticos com cloranfenicol e cicloheximida, torna o meio seletivo. O antibiótico impede o crescimento de bactérias, enquanto a cicloheximida evita a contaminação por fungos saprófitos, (OLIVEIRA, 2014; DEORUKHKAR e SAINI, 2014). O diferencial do nosso estudo foi a não utilização de antibiótico no Agar ACP, diferentemente da maioria dos estudos. Segundo LIMA et al (2009) as espécies isoladas, em meio de cultura Sabouraud, possuíam características macroscópicas de leveduras, mostrando-se colônias esbranquiçadas, lisas ou rendadas após 24 a 48 horas do semeio em ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol. No Ágar Água de Coco em Pó (ACP) obteve crescimento de colônias a partir de 18 horas, que pode ser devido às diferenças na composição química da água de coco em pó.

A partir de colônias isoladas em culturas em meio ágar Sabouraud é possível identificar o gênero *Candida* e diferenciar as espécies. Muitos estudos demonstram que para o isolamento e identificação dessa levedura, os meios devem possuir substâncias essenciais para sua reprodução e garantir seu crescimento, tais como: Ágar Sabouraud com cloranfenicol e CHROMagar Candida. CORONADO e JIMÉNEZ (2013), TRNOVSKY et al. (2008), AHMAD et al. (2012) SAIGAL et al. (2011). Os dados da pesquisa são relevantes, uma vez que *C. albicans* apresentaram um aumento de UFC/mL no meio proposto em relação ao meio de cultura convencional.

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi observado o potencial de isolamento da *C. albicans* no meio proposto, destacando o expressivo resultado apresentado nas diluições em relação ao verificado no meio de cultura convencional. Os resultados favoreceram a detecção de fungos oportunistas. Representando assim uma possível aplicação desse produto na prevenção adequada para que se possa facilitar o diagnóstico e otimizar a terapia.

Foi possível observar que a água de coco em pó (ACP) potencializou o crescimento da cepa de *Candida albicans* avaliada, apresentando um crescimento de colônias superior em relação ao meio convencional.

6 PERSPECTIVA

É importante destacar que não foi avaliado o crescimento em amostras clínicas, as quais podem apresentar diversos outros microrganismos inibidores do crescimento de espécies de *Candida*. Nesse sentido, faz-se necessário outros estudos para avaliar tanto a especificidade do meio proposto para o gênero *Candida*, quanto o potencial de identificação da espécie *C. albicans*.

REFERÊNCIAS

- ÁLVARES, C. A.; SVLDZLNSKI, T. I. E.; CONSOLARO, M. E. L. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 5, p. 319-327, 2007.
- AHMAD, S. et al. Performance comparison of phenotypic and molecular methods for detection and differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. **BMC infectious diseases**, v. 12, n. 1, p. 1-5, 2012.
- ARRAM, S. B. I. **Epidemiologia molecular de isolados de *Candida* spp. Obtidos de pacientes pediátricos com candidemia**. Dissertação (Programa de PósGraduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) - Setor de Ciências Biológicas e Setor da Saúde, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, p. 60, 2008.
- ATAÍDES, F. S.; ABRÃO, F.Y.; COSTA, C.R.; SILVA, M. R. R.; PIMENTA, F. C.; PALOS, M.A.P.; SOUZA, L.K.H. Identificação de espécies de *Candida* em saliva de profissionais da saúde. **Rev. Eletr. Enf.** v. 12, n. 3, p. 498-501, 2010.
- BARBEDO, L. S.; SGARBI, D. B. G. Candidíase. DST - DST - **J Bras Doenças Sex Transm.** v. 22, n.1, p. 22-38, 2010.
- BARBOSA N. T., SOUZA G. F. M., ANJOS R. S.: **Prevalência e identificação de espécies *Candida* em usuários de próteses totais**. Disponível: <https://www.revistacirurgiabmf.com/2018/04/Artigos/02ArtOrigPrev.pdf>. Acesso em: 10 mai. 2021.
- Manual BD Mycosel Agar - BD Sabouraud Agar with Chloramphenicol and Cycloheximide**. Disponível em: <https://legacy.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/HB/CE/PA/PT-PA-254417.pdf>. Acesso em: 10 mai. 2021.
- Manual BD Sabouraud GC Agar/CHROMagar Candida Medium (Biplate)**. Disponível em: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=25490>. Acesso em: 10 mai. 2021.
- CALDERONE, R. A.; FONZI, W. A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends in microbiology**, v. 9, n. 7, p. 327-335, 2001.
- CAMARGO, F. P. et al. Isolamento de *Candida* sp da mucosa vaginal de mulheres atendidas em um serviço de ginecologia do município de Santo Ângelo-RS. **NewsLab**, v. 87, n. 6, p. 96-104, 2008.
- CÂMARA, S. R. et al. Análise microbiológica e proteica da água de coco em pó (ACP) esterilizada por membrana para uso em processos biotecnológicos. **RPCV**, v. 106, p. 99-103, 2011.

- CANDIDO, R. C.; AZEVEDO, R. V. P.; KOMESU, M. C. Enzymotiping of species of the genus *Candida* isolated from the oral cavity. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 5, p. 437-442, 2000.
- CARDOSO, W.M. et al. Água de coco em pó – ACP 201® como diluente vacinal do vírus da doença de Newcastle em pombos domésticos (*Columba livia*). **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.101, p.57-60, 2006b.
- CARVALHO, J. M. et al. Água-de-coco: Propriedades nutricionais, funcionais e processamento. **Ciências agrárias**, Londrina, v. 27, n. 3, p. 437-452, 2006
- COLOMBO, Arnaldo Lopes; GUIMARAES, Thaís. Candidúria: uma abordagem clínica e terapêutica. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 40, n. 3, p. 332-337, 2007.
- CORONADO, L. C.; JIMÉNEZ, Y. S. Clinical and microbiological diagnosis of oral candidiasis. **Journal of clinical and experimental dentistry**, v. 5, n. 5, p. 279, 2013.
- DEORUKHKAR, S.C.; SAINI, S. Laboratory approach for diagnosis of candidiasis through ages. **International Journal of Current Microbiology and Applied Acienes**, v. 3, n. 1, 2014.
- CULTLER, J. E. Putative virulence factors of *Candida albicans*. **Annual review of microbiology**, v. 45, n. 1, p. 187-218, 1991.
- VEIRA, D. A. P., FERNANDES, N. C. A. Q.: *Microbiologia Aplicada / Inhumas*: IFG; Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2012. 90 p. Disponível em: https://www.ufsm.br/app/uploads/sites/413/2018/12/04_microbiologia_aplicada.pdf. Acesso em: 20 abr. 2021.
- ESQUENAZI, D. et al. Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn (Palmae) husk fiber extract. **Research in microbiology**, v. 153, n. 10, p. 647-652, 2002.
- FARAH, C.S.; LYNCH, N.; MCCULLOUGH, M.J. Oral Fungal Infection: An Update For The General Practitioner. **Australian dental journal**, v. 55, p. 48-54, 2010.
- FONSECA, A.M. et al. Coconut water (*Cocos nucifera* L.) – A new biocatalyst system for organic synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 57, n. 1-4, p. 78-82, 2009.
- FRANÇA, J. C. B.; RIBEIRO, C. E. L.; QUEIROZ-TELLES, F. de. Candidemia em um hospital terciário brasileiro: incidência, frequência das diferentes espécies, fatores de risco e suscetibilidade aos antifúngicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 1, p. 23-28, 2008.
- GOMES C. L., et al. Identificação e perfil de sensibilidade de *Candida* spp. isoladas de urina de pacientes com candidúria em Iguatu -Ceará. **Rev. Bras. Anál. Clín.** Rio de Janeiro, v.42, n.3, 2010:
- GOPIKRISHNA, V., THOMAS, T., KANDASWAMY, D. A quantitative analysis of coconut water: a new storage média for avulsed teeth. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontology**, v. 105, p.61-65, 2008

- IDIGAL, P. G.; SVIDZINSKI, T. I. E. Leveduras nos tratos urinário e respiratório: infecção fúngica ou não? **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v. 45, n. 1, p. 55-64, 2009.
- LACAZ, Carlos da Silva. et al. Leveduras profundas com especial referência às infecções por Cândida. In: _____ **Tratado de Micologia Médica Lacaz**. São Paulo: sarvier, cap. 26, p. 123-154, 2002.
- LIMA, K. N., et al. Espécies e suscetibilidade antifúngica in vitro de leveduras isoladas em unhas de pacientes com vírus da imunodeficiência humana. **Revista de Ciências Médicas**, v. 18, n. 2, p. 89-97, 2012.
- KLOTZ, S. A. et al. Polymicrobial bloodstream infections involving Candida species: analysis of patients and review of the literature. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 59, n. 4, p. 401-406, 2007.
- MALUCHE, M.E; SANTOS, J.I. Candida sp. e Infecções Hospitalares: aspectos epidemiológicos e laboratoriais. **Rev. bras. anal. clin**, p. 65-67, 2008.
- MEDRANO, D.J.A. Perfil de Sensibilidade e Genotipagem de Leveduras Isoladas de Pacientes com Candidemia em dois Hospitais de Referência Terciária de FortalezaCeará. Dissertação. Universidade Federal do Ceará. 2004. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/1884>. Acesso em: 22 Mar. 2021.
- MENEZES, E.A.; MENDES, L.G; CUNHA, F.A. Antifungal resistance of Candidatropicalis isolated in the State of Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 3, p. 354-355, 2009.
- MENEZES, E. A.; CUNHA, M. C. S. O.; CUNHA, F. A. Identificação preliminar de algumas espécies do gênero *Candida* spp. em meio cromógeno: resultados de dois anos de um estudo multicêntrico realizado no Ceará. **Revista de Patologia Tropical/Journal of Tropical Pathology**, v. 40, n. 4, p. 297-303, 2011.
- MIMICA, Lycia Mara Jenne et al. Diagnóstico de infecção por Candida: avaliação de testes de identificação de espécies e caracterização do perfil de suscetibilidade. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, n. 1, p. 17-23, 2009.
- NUNES, C.F., et al. Diferentes suplementos no cultivo in vitro de embriões de pinhão-mansão. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 43, n. 1, p. 9-14, 2008.
- OLIVEIRO, C. A. et al. Susceptibilidad in vitro a anidula fungina en 100 cepas de especies de Candida aisladas previo ala introducción de esta equinocandina en Chile. **Rev Chil Infect**, v. 28, n. 5, p. 399-403, 2011.
- OLIVEIRA, J.C. **Tópicos em Micologia Médica**. 4 ed. Rio de Janeiro: Control-Lab, 2014.
- PFALLER, M.A; DIEKEMA, D.J. Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. **Clinical microbiology reviews**, v. 20, n. 1, p. 133-163, 2007.

- PRICE, M.F.; WILKINSON, I.D.; GENTRY, I.O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 20, n. 1, p. 7-14, 1982.
- RIBEIRO, P.M; KOGAITO, C.Y; JUNQUEIRA, J.C; JORGE, A.O.C. Isolamento de *Candida* spp. com utilização de meio de cultura cromogênico CHROMagar *Candida*. **Brazilian Dental Science**, v. 12, n. 4, p. 40-45, 2009.
- RICHTER, E.M., et al. Determination of anions, cations and sugars in coconut water by capillary electrophoresis. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6A, p. 1134-1139, 2005.
- RODRIGUES, M. L. T. **Avaliação de métodos para testes de suscetibilidade in vitro de enxaguantes bucais frente a espécies do gênero *Candida***. 2008. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008. doi:10.11606/D.60.2008.tde-17122008-185330. Acesso em: 10 abr. 2021.
- ROSA, M. I. da; RUMEL, D. Fatores associados à candidíase vulvovaginal: estudo exploratório. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 1, p. 6570, Feb. 2004.
- ROSSI, T. de et al. Interações entre *Candida albicans* e hospedeiro. **Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 32, n. 1, p. 15-28, jan./jun. 2011
- RUIZ, L.S, et al. Fungemia by yeasts in Brazil: occurrence and phenotypic study of strains isolated at the Public Hospital, Botucatu, São Paulo. **Journal de Mycologie Medicale. Moulineaux Cedex 9: Masson Editeur**, v. 15, n. 1, p. 13-21, 2005. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/36554>>. Acesso em: 20 mar. 2021.
- TONIOLLI, R., et al. Uso do diluente água de coco em pó (ACP-103®) na conservação prolongada do sêmen do varrão: avaliação in vitro e in vivo. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.62, n.5, p.1072-1079, 2010
- SALGUEIRO, C. C. M. et al. Água de coco em pó em biotécnica da reprodução de caprinos. **Ci. Anim.**, v. 22, n. 1, p. 20-32, 2012.
- SAIGAL, S. S. et al., Identification of *Candida albicans* by using different culture medias and its association in potentially malignant and malignant lesion. **Contemporary clinical dentistry**, v. 2, n. 3, p. 188, 2011.
- SIDRIM, J. J. C; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. 1ª. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 200- 266, 2004.
- SILVA, A. C. N.; VASCONCELOS-JÚNIOR, A. A. de; CUNHA, F. A. et al. Teste de sensibilidade de *Candida albicans* pelo método de disco-difusão: uma comparação de meios de cultura. **RBAC**, v. 48, n. 4, p. 363-9, 2016.
- SOARES, D. M. et al. Candidíase vulvovaginal: uma revisão de literatura com abordagem para *Candida albicans*. **Braz J. Surg and Clin Res–BJSCR**, v. 25, n. 1, p. 28-34, 2018.

SOARES, L. P. M. A.; OLIVEIRA, R. T. de; CARNEIRO, I. C. R. S. Bloodstream infection by *Candida* spp. in the neonatal unit of a teaching hospital from North Region, Brazil: study of risk factors/Infecções da corrente sanguínea por *Candida* spp. em unidade neonatal de hospital de ensino da Região Norte do Brasil: estudo dos fatores de risco. **Rev Pan-Amaz Saude**, p. 19-24.

SOUZA, M. A. F. **Patogenia e diagnóstico da candidíase vaginal**. Monografia (Pós-Graduação em Citologia Clínica), Centro de Capacitação Educacional, Instituto Nacional de Ensino Superior e Pesquisa. Recife, p. 44, 2017. Disponível em: <https://www.ccecursos.com.br/img/resumos/04-patogenia-e-diagn-stico-da-candidase-vaginal.pdf>. Acesso em: 10 abril. 2021.

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

SILVA, A. L. **Potencial da radiação ultravioleta na inibição de fungos leveduriformes e filamentosos**. 2017. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pelotas.

SALGUEIRO, C. C. M.; NUNES, J. F. Água de coco em pó em biotécnicas da reprodução de caprinos. **Ciência Animal**, Fortaleza, v. 22, n. 1, p. 20-32, jun 2012.

UNAGUL, Panida et al. Coconut water as a medium additive for the production of docosahexaenoic acid (C22: 6 n3) by *Schizochytrium mangrovei* Sk-02. **Bioresource technology**, v. 98, n. 2, p. 281-287, 2007.

SAMARANAYAKE, L. P.; RAESIDE, J. M.; MACFARLANE, T. W. Factors affecting the phospholipase activity of *Candida* species in vitro. *Sabouraudia*: **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 22, n. 3, p. 201-207, 1984.

VIANI, P. R. C. **Candida provenientes de infecção hospitalar isoladas de pacientes internados em hospital infantil do estado de São Paulo e avaliadas por marcadores fenotípicos**. 2007. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007. doi:10.11606/D.42.2007.tde-31012008-113443. Acesso em: 21 abr. 2021.

ZHAO, X. et al. ALS3 and ALS8 represent a single locus that encodes a *Candida albicans* adhesin; functional comparisons between Als3p and Als1p. **Microbiology**, v. 150, n. 7, p. 2415-2428, 2004.

YERA, H. et al. Polymicrobial candidaemia revealed by peripheral blood smear and chromogenic medium. **Journal of clinical pathology**, v. 57, n. 2, p. 196-198, 2004.

APÊNDICE A – Artigo submetido a Revista de Ciências Médicas e Biológicas (*Journal of Medical and Biological Sciences*)

EFEITO DA ADIÇÃO DE ÁGUA DE COCO EM PÓ NO ENRIQUECIMENTO DE MEIO DE CULTURA PARA *Candida albicans*

¹Marcileide da Silva Santos, ²Rodrigo Antônio Torres Matos, ³Márcio Calixto Matias, ⁴Camila Calado de Vasconcelos, ⁵Felipe Paiva, ⁶Cristiane Clemente de Mello Salgueiro, ⁷Valesca Barreto Luz

RESUMO

As espécies de *Candida* são consideradas patógenos oportunistas, entretanto, esses microrganismos são encontrados normalmente no corpo humano. A capacidade patogênica das *Candida* spp. está relacionada a uma combinação de fatores que potencializam sua virulência. Dentre estes, destaca-se a produção de enzimas hidrolíticas extracelulares, que auxiliam em seu processo de invasão tecidual. O diagnóstico clínico e laboratorial é importante para o tratamento adequado. Atualmente indica o uso do meio de cultura Saboraud para isolamento de *Candida* spp. Nesta perspectiva objetivou-se avaliar o tempo de isolamento e crescimento da *Candida albicans* em um meio de cultura enriquecido com a adição de água de coco em pó (ACP), que se destaca por sua rica composição em nutrientes, e assim comparar o meio proposto ao convencional, quanto ao tempo de crescimento da *C. albicans*. Após o preparo da base, foi acrescentada 18g de ACP. Como resultados o meio no ágar com ACP apresentou maior contagem de leveduras (UFC/mL) em relação ao meio convencional (Saboraud) em um menor intervalo de tempo, pois a água de coco em pó (ACP) potencializou o crescimento da cepa de *Candida albicans*, de modo que já em 18 horas foi possível observar um crescimento de colônias bem mais elevado do que na concentração de 10^{-2} do meio convencional. Em conclusão, foi possível observar que a ACP potencializou o crescimento da cepa de *Candida albicans* avaliada, apresentando um crescimento de colônias superior em relação ao meio convencional.

Palavras-chave: *Candida*, meio de cultura; isolamento

¹Mestranda em Biotecnologia pelo Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Biotecnologia em Saúde Humana e Animal – PPGBIOTEC no Centro Universitário Cesmac, Biomédica e coordenadora geral de laboratórios no Centro Universitário Cesmac, Alagoas, Brasil; ²Doutor em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, Paraíba, Brasil, Docente do Curso de Medicina Veterinária no Centro Universitário, Alagoas, Brasil; ³Mestre em Ciência Animal pelo Programa de Inovação e Tecnologias Aplicadas a Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Alagoas – UFAL, Alagoas, Brasil, Docente do Curso de Medicina Veterinária no Centro Universitário, Alagoas, Brasil; ⁴Doutora em Ciências pelo Instituto de Química e Biotecnologia – IQB na Universidade Federal de Alagoas – UFAL, Alagoas, Brasil, Docente do PPGBIOTEC e Curso de Farmácia no Centro Universitário, Alagoas, Brasil; ⁵Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidad Complutense de Madrid, Espanha, Docente do PPGBIOTEC na Universidade Estadual do Ceará, Ceará, Brasil; ⁶Discente do curso de Medicina no Centro Universitário, Alagoas, Brasil; ⁷Doutora em Biotecnologia pela Universidade Estadual do Ceará – UECE, Ceará, Brasil, Coordenadora do PPGBIOTEC ponto focal Alagoas e docente do Curso de medicina Veterinária no Centro Universitário, Alagoas, Brasil;

ABSTRACT

Candida species are considered opportunistic pathogens, however, these microorganisms are normally found in the human body. The pathogenic capacity of *Candida* spp. is related to a combination of factors that enhance its virulence. Among these, the production of extracellular hydrolytic enzymes stands out, which help in the process of tissue invasion. Clinical and laboratory diagnosis is important for proper treatment. Currently, it indicates the use of Sabouraud culture medium for the isolation of *Candida* spp. The aim of this study was to evaluate the isolation and growth time of *Candida albicans* in a culture medium enriched with the addition of powdered coconut water (PCA), which stands out for its rich composition in nutrients, and thus to compare the proposed medium to the conventional, regarding the growth time of *C. albicans*. After preparing the base, 18g of PCA was added. As a result, the medium in the agar with PCA showed higher yeast counts (CFU/mL) compared to the conventional medium (Sabouraud) in a shorter time interval, because powdered coconut water (PCA) potentiated the growth of the *Candida albicans* strain, so that already in 18 hours it was possible to observe a growth of colonies much higher than in the concentration of 10^{-2} of the conventional medium. In conclusion, it was possible to observe that PCA potentiated the growth of the *Candida albicans* strain evaluated, showing a superior colony growth in relation to the conventional medium.

Keywords: *Candida*; culture medium; isolation

INTRODUÇÃO

Assim como as outras espécies do gênero *Candida*, *Candida albicans* pode causar graves infecções em pacientes imunocomprometidos e em outras situações hospitalares que causem dano ao sistema imunológico. A *C. albicans* tornou-se um patógeno humano de grande relevância clínica, dado que está associado a altos níveis de morbidade e mortalidade resultantes de infecções em pacientes hospitalizados.

As leveduras do gênero *Candida* caracterizam-se por serem seres unicelulares, eucarióticos, heterotróficos e que possuem o glicogênio como substância de reserva energética (VIANI, 2007). Leveduras deste gênero possuem distribuição universal, sendo encontradas em diversos ambientes; com o corpo humano elas mantêm uma relação de comensalismo, fazendo, deste modo, parte da microbiota humana e não causando prejuízos, quando em condições de normalidade fisiológica (RODRIGUES, 2008).

São conhecidas cerca de dezessete espécies de *Candida* de interesse clínico (BARBEDO; SGARBI, 2010) e as infecções da corrente sanguínea por *Candida* são uma preocupação particular para pacientes imunocomprometidos, pacientes em ambientes de terapia intensiva, pacientes com cateteres centrais e pacientes que apresentam nutrição

parenteral e/ou antibióticos de amplo espectro por tempo prolongado. As espécies de *Candida* são determinadas em até 15% das espécies nosocomiais da corrente sanguínea e estão associadas a uma taxa de mortalidade de 5% a 71%.

Candida é a principal causa de infecção fúngica com espectro de gravidade que pode variar de infecção mucocutânea à infecção com risco de vida. Fatores de risco relacionados ao desenvolvimento desta infecção são: uso de antibiótico de amplo espectro, uso de cateter venoso central, nutrição parenteral, diálise, neutropenia, doença hematológica maligna, cirurgia gastrointestinal, idosos, prematuros, presença de dispositivos implantáveis e uso de imunossupressores. Internamento em UTI permite a transmissão de espécies de *Candida* e é um fator de risco adicional independente (SIMOES, 2005).

A capacidade patogênica das *Candida* está relacionada a uma combinação de fatores que potencializam sua virulência. Dentre estes, destaca-se a produção de enzimas hidrolíticas extracelulares, que auxiliam em seu processo de invasão tecidual. Um estudo recente relatou um aumento de candidemia de 50% entre 2000 a 2005 e demonstrou que a *Candida albicans* continua sendo a principal causa de infecções da corrente sanguínea em ambientes hospitalares (SOARES, OLIVEIRA e CARNEIRA, 2013).

Nesse contexto, as infecções por *Candida albicans* tem gerado grande interesse entre pesquisadores, dado seu grande potencial patogênico, principalmente em ambientes hospitalares. Em virtude disso, tornou-se indispensável a implementação de protocolos padrão para identificação de patogênicos fúngicos e especialmente de *C. albicans* (SILVA, 2017).

Atualmente o protocolo indica o uso do meio de cultura Sabouraud como padrão ouro para isolamento de *Candida*. E a partir de uma identificação morfológica, o isolado é transferido para o meio CHROMagar *Candida* para determinação da espécie. Tal procedimento, apesar de sua eficiência torna-se bastante oneroso quanto ao tempo e o custo para determinação das espécies (ARRAM, 2008).

Desta forma, verificou-se a necessidade de desenvolver um meio mais seletivo e rápido para isolamento de *C. albicans*. Nesta perspectiva o presente estudo visou avaliar o tempo de isolamento e crescimento da *Candida albicans* em um meio de cultura enriquecido com a adição de água de coco em pó (ACP).

MATERIAL E MÉTODOS

Tipo de estudo

O estudo possui caráter qualitativo e por se tratar de um estudo com cepa fúngica padrão, o presente estudo não necessitou de apreciação do Comitê de ética.

Origem das amostras

A cepa padrão do fungo utilizada no trabalho foi proveniente da micoteca da UFPE/URM *Candida albicans* URM5689, meios de cultura cedidos pelo Centro Universitário – Cesmac e Água de coco em pó – ACP-326 cedida pela Startup ACP Biotecnologia da Universidade Estadual do Ceará.

Procedimentos

Preparação dos meios de cultura

O meio ágar Sabouraud foi preparado de acordo com as instruções do fabricante. Para o preparo do meio de cultura contendo ACP, foram pesadas 7,5g de ágar (Kasvi, Itália), para 200ml de água destilada. Após a pesagem, hidratou-se o mesmo com uma pequena quantidade de água destilada, até torná-lo úmido, em seguida, acrescentou-se o restante da água com o auxílio de uma proveta e um bastão de vidro. Após o preparo da base, foi acrescentada 18g de água de coco em pó, conforme indicado.

Após homogeneização, o pH determinado e corrigido, uma vez que os fungos se desenvolvem melhor em pH levemente ácido (pH 5.5) a solução foi transferida para um Erlenmeyer e esterilizada em autoclave a 121°C/15 min, sendo os meios distribuídos em placas de Petri descartáveis e estéreis, próximo ao bico de Bunsen.

Controle de qualidade

Para o controle de qualidade, 10% dos meios confeccionados foram incubados em estufa bacteriológica a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas para o controle de esterilidade. Todos os meios confeccionados foram devidamente identificados com o nome, data de fabricação, data de validade e tipo de armazenamento e embalados em filme plástico PVC

transparente para evitar o ressecamento. Após 24 horas, os meios preparados não sofreram alterações em seu aspecto e não foi observado crescimento de qualquer colônia ou contaminação.

Cultivo da cepa

Previamente ao cultivo foi preparada uma suspensão de 1 ml *Candida albicans* URM5689 com 0,1 mL com uma alça calibrada e transferida para um tubo de cultura com 9 ml de solução salina de 0,9% esterilizada (10^{-1}) que foi homogeneizada em agitador de tubos. Em seguida, realizou-se uma diluição seriada até se atingir a diluição 10^{-6} . Após as diluições, foi realizada a semeadura em placas de Petri contendo o meio de cultura, pipetando 0,1 ml de cada diluição e espalhando o inóculo com auxílio da alça de Drigalsky.

A avaliação do crescimento foi determinada por contagem em placas do número de células viáveis (UFC/mL). Após o crescimento, foi feita a contagem de unidades formadoras de colônias nos dois meios. A contagem de cada placa foi realizada para estimar o número de colônias, escolhendo as placas que apresentaram de 10 a 150 colônias. E o cálculo da média da unidade formadora de colônia (UFC) conforme descrito por VIEIRA e FERNANDES, 2012.

Análise estatística

Para avaliar a normalidade foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov, em seguida foi utilizado uma análise de variância (Two-Way ANOVA) para comparar os meios de cultura e as concentrações estudadas, posteriormente foi realizada uma análise de medidas repetidas no tempo comparando a quantidade de colônias durante os períodos observados. As médias foram comparadas através do teste de Tukey assumindo 5% de significância. Todos os dados foram analisados através do software RStudio v1.4.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta pesquisa avaliou o crescimento da cepa de *Candida albicans* URM 5689 em um meio de cultura a base de água de coco em pó - ACP. A partir de diluição em série foi

possível destacar crescimento elevado da *Candida albicans*, demonstrando a diferença entre o meio ágar ACP e o meio Sabouraud.

Verificou-se que na diluição de 10^{-1} nos tempos de incubação de 18, 24 e 48 horas, não foi possível observar diferenças significativas na quantidade de UFC/mL quando observados os meios de forma individual, bem como quando comparados entre si ($p > 0,05$). Na diluição de 10^{-2} , quando observado apenas o meio proposto (Ágar ACP), não houve diferença significativa, sendo que a quantidade de colônias foi igual ou superior a 3.000 UFC/mL em todos os tempos de incubação (Tabela 1).

Tabela 1 - Valores médios de colônias da cepa de *Candida albicans* em relação meio de cultura Sabouraud e Ágar ACP, diluição e tempo de incubação.

Diluições	Tempos de incubação de <i>C. albicans</i> nos meios de cultura					
	18 horas		24 horas		48 horas	
	Ágar ACP	Ágar Sabouraud	Ágar ACP	Ágar Sabouraud	Ágar ACP	Ágar Sabouraud
10^{-1}	$\geq 3.000 \pm 0^a$	$\geq 3.000 \pm 0^a$	$\geq 3.000 \pm 0^a$	$\geq 3.000 \pm 0^a$	$\geq 3.000 \pm 0^a$	$\geq 3.000 \pm 0^a$
10^{-2}	$\geq 3.000 \pm 0^a$ *	$43,33 \pm 6,66^{Bb}$ *	$\geq 3.000 \pm 0^a$	$\geq 3.000 \pm 0^{Aa}$	$\geq 3.000 \pm 0^a$	$\geq 3.000 \pm 0^{Aa}$
10^{-3}	$55,33 \pm 2,90^{Bb}$ *	$19,00 \pm 3,78^{Bc}$ *	$\geq 3.000 \pm 0^{Aa}$ *	$21,66 \pm 10,40^{Bb}$ *	$\geq 3.000 \pm 0^{Aa}$	$\geq 3.000 \pm 0^{Aa}$
10^{-4}	0^{Bc}	0^{Bd}	$14,33 \pm 3,92^{ABb}$	$8,33 \pm 1,20^{Ab}$	$17,66 \pm 5,36^{Ab}$	$11,00 \pm 2,08^{Abc}$
10^{-5}	0^{Bc}	0^{Bd}	$9,00 \pm 1,73^{Ab}$	$6,33 \pm 0,88^{Ab}$	$12,66 \pm 1,76^{Ab}$ *	0^{Bc} *
10^{-6}	0^c	0^d	0^c	0^c	0^c	0^c

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as diluições.

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os períodos avaliados para o cada meio e cultura.

Asteriscos (*) na mesma linha representa diferença significativa ($p < 0,05$) entre as os meios de cultura em cada período.

ACP: água de coco em pó;

No Ágar Sabouraud Dextrose (SDA), houve um crescimento maior de UFC/mL nos tempos de 24 e 48 horas quando comparado ao tempo de 18 horas, havendo diferença estatisticamente significante. Também foi possível observar uma diferença significativa na quantidade de UFC/mL entre os meios no tempo de 18 horas ($p < 0,05$). quando observado apenas o meio proposto (Ágar ACP), a quantidade de colônias foi igual ou superior a 3.000 UFC/mL em todos os tempos de incubação.

Na diluição de 10^{-3} , quando observado apenas o Ágar ACP, não houve diferença significativa ($p > 0,05$). Entre os tempos de incubação de 24 e 48 horas, porém, nestes dois tempos de incubação, a contagem de UFC/mL foi significativamente superior ao

verificado no tempo de 18 horas ($p < 0,05$). No SDA houve uma diferença significativa na contagem de UFC/mL entre os tempos de incubação, sendo observado uma maior quantidade UFC/mL no tempo de 48 horas.

Comparando os meios foi observado um maior número de UFC/mL no ágar ACP nos tempos de 18 e 24h, não sendo observada diferença significativa no tempo de 48 horas. Nas diluições de 10^{-4} e 10^{-5} no meio ágar ACP houve diferença significativa crescente de UFC/mL entre os tempos de incubação. Avaliando o SDA na diluição de 10^{-4} houve diferença significativa crescente de UFC/mL entre os tempos de incubação, enquanto, na diluição 10^{-5} houve uma maior quantidade de UFC/mL apenas no tempo de 24 horas quando comparados aos demais tempos de incubação. Comparando os meios nas diluições de 10^{-4} e 10^{-5} foi observado uma maior quantidade de UFC/mL no ágar proposto com 24 e 48 horas de incubação.

A cepa de *Candida albicans* estava presente da diluição 10^{-1} a 10^{-5} , mas para o nosso produto não apresentou UFC/mL observadas nas placas 10^{-6} .

De acordo com FARAH (2010), os testes microbiológicos, utilizando o meio ágar Sabouraud Dextrose (SBD), são os de escolha para o isolamento de leveduras do gênero *Candida*, especialmente oriundas de culturas mistas pela facilidade de manejo, custo e resultados. Quando adicionado de cloranfenicol torna-se mais seletivo, pela capacidade de inibir o crescimento da maioria de espécies bacterianas. Os dois meios de cultura foram eficientes para o desenvolvimento da cepa de *C. albicans*, contudo observou-se maior número de UFC/mL no meio proposto com ACP em relação meio convencional Sabouraud, em virtude do alto teor de glicose, proteínas e um pH mais ácido encontrado na água de coco em pó.

As espécies do gênero *Candida*, geralmente, se desenvolvem bem em meios de cultura de composição relativamente simples como o Sabouraud Dextrose, desenvolvendo colônias com aspecto característico na sua maioria com colônias glabras, de coloração branca ou bege, textura cremosa e superfície lisa (LACAZ *et al.* 2002). O estudo demonstrou crescimento com colônias características com coloração branco amarelada, porém a adição da água de coco de em pó – ACP 326 potencializou o crescimento de colônia, devido aos nutrientes encontrados na água de coco sais minerais tais como: Na^+ , Ca^{2+} , Fe^{3+} , K^+ , Mg^{2+} e PO_4^{3-} .

Em pesquisas realizadas por Marques e Silva (1981) foram comparados os crescimentos de cultivos de diversos cogumelos em ágar de água-de-coco, como aquele observado nos meios Sabouraud e Sabhi, a fim de testar sua eficiência, verificando-se que o ágar de água-de-coco se comporta tão bem quanto os meios avaliados, para evidenciar o início do crescimento de fungos mantidos em laboratório. Os resultados desta pesquisa corroboram com estes autores quando se observa a água de coco como meio de cultura mostrou-se eficiente para o crescimento fúngico.

Câmara e colaboradores (2011), observaram que as características nutricionais da água de coco têm possibilitado seu uso em diversas aplicações biotecnológicas, das quais destacamos: uso da água de coco como meio de enriquecimento para bactérias (ESQUENAZI et al., 2002), diluente de vacinas virais (CARDOSO et al., 2006), meio para fungos (UNAGUL et al., 2007) e implantes dentários (GOPIKRISHNA et al., 2008). Reforçando, o interesse no potencial de utilização que água de coco possui como meio de cultura para desenvolvimento de microrganismos.

O Ágar Sabouraud Dextrose (ASD), denominado simplesmente de Ágar Sabouraud, também apresenta elevadas concentrações de carboidratos e pH 5,6, fatores que favorecem o crescimento de diversos fungos leveduriformes e filamentosos (WINN et al., 2008). Os resultados desta pesquisa apresentam que a água de coco como meio de cultura revela-se eficiente em virtude das moléculas de açúcares, as vitaminas e os sais minerais presentes na composição da água de coco e o pH.

A suplementação do Sabouraud com antibióticos com cloranfenicol e cicloheximida, torna o meio seletivo. O antibiótico impede o crescimento de bactérias, enquanto a cicloheximida evita a contaminação por fungos saprófitos, (OLIVEIRA, 2014; DEORUKHKAR e SAINI, 2014). O diferencial do nosso estudo foi a não utilização de antibiótico no Agar ACP, diferentemente da maioria dos estudos.

Segundo LIMA et al (2009) as espécies isoladas, em meio de cultura Sabouraud, possuíam características macroscópicas de leveduras, mostrando-se colônias esbranquiçadas, lisas ou rendadas após 24 a 48 horas do semeio em ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol. No Ágar Água de Coco em Pó (ACP) obteve crescimento de colônias a partir de 18 horas, que pode ser devido às diferenças na composição química da água de coco em pó.

A partir de colônias isoladas em culturas em meio ágar Sabouraud é possível identificar o gênero *Candida* e diferenciar as espécies. Muitos estudos demonstram que para o isolamento e identificação dessa levedura, os meios devem possuir substâncias essenciais para sua reprodução e garantir seu crescimento, tais como: Ágar Sabouraud com cloranfenicol e CHROMagar Candida. CORONADO e JIMÉNEZ (2013); TRNOVSKY et al. (2008); AHMAD et al. (2012); SAIGAL et al. (2011). Os dados da pesquisa são relevantes, uma vez que *C. albicans* apresentaram um aumento de UFC/mL no meio proposto em relação ao meio de cultura convencional.

CONCLUSÃO

Neste trabalho foi observado o potencial de isolamento da *C. albicans* no meio proposto, destacando o expressivo resultado apresentado nas diluições em relação ao verificado no meio de cultura convencional. O resultado obtido serve como uma reposta positiva para a detecção e alerta de fungos oportunistas. Representando assim uma possível aplicação desse produto na prevenção adequada para que se possa facilitar o diagnóstico e otimizar a terapia.

Foi possível observar que a água de coco em pó (ACP) potencializou o crescimento da cepa de *Candida albicans* avaliada, apresentando um crescimento de colônias superior em relação ao meio convencional.

REFERÊNCIAS

AHMAD, S.; KHAN, Z; ASADZADEH, M.; THEYYATHEL, A.; CHANDY, R. Performance comparison of phenotypic and molecular methods for detection and differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. **BMC Infect Dis.** 2012;12:230. Published 2012 Sep 25. doi:10.1186/1471-2334-12-230.

ARRAM, SOHAILA BOEHM IBRAHIM. **Epidemiologia molecular de isolados de *Candida* spp. obtidos de pacientes pediátricos com candidemia.** 2008. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas e Setor da Saúde, Curitiba, 2008.

BARBEDO, L. S.; SGARBI, D. B. G. Candidíase. **DST - J Bras Doenças Sex Transm.** v. 22, n.1, p. 22-38, 2010. Disponível em: <http://www.dst.uff.br/revista22-1-2010/4-%20Candidiase.pdf>. Acessado em: 18 fev. 2022.

CÂMARA, S. R. et al. Análise microbiológica e proteica da água de coco em pó (ACP) esterilizada por membrana para uso em processos biotecnológicos. **RPCV**, v. 106, p. 99-103, 2011.

CARDOSO, W. M. et al. Água de coco em pó – ACP 201® como diluente vacinal do vírus da doença de Newcastle em pombos domésticos (*Columba livia*). **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.101, p.57-60, 2006.

CORONADO-CASTELLOTE, L.; JIMÉNEZ-SORIANO, Y. (2013). Clinical and microbiological diagnosis of oral candidiasis. **Journal of clinical and experimental dentistry**, 5(5), e279–e286. <https://doi.org/10.4317/jced.51242>

DEORUKHKAR, S. C.; SAINI, S. (2014). Laboratory approach for diagnosis of candidiasis through ages. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, 3(1), 206-218. Disponível em: <https://www.ijcmas.com/vol-3-1/Sachin%20C%20Deorukhkar%20and%20%20Santosh%20Saini.pdf>. Acessado em: 18 fev. 2022.

FARAH, C. S.; LYNCH, N.; MCCULLOUGH, M. J. (2010). Oral fungal infections: an update for the general practitioner. *Australian dental journal*, 55 Suppl 1, 48–54. <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2010.01198.x>

GOPIKRISHNA, V.; THOMAS, T.; KANDASWAMY, D. (2008). A quantitative analysis of coconut water: a new storage media for avulsed teeth. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*, 105(2), e61–e65. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2007.08.003>

LACAZ, C. S. *et al.* Leveduras profundas com especial referência às infecções por Cândida. In: _____ **Tratado de Micologia Médica Lacaz**. São Paulo: sarvier, cap. 26, p. 123-154, 2002.

LIMA, K. M. *et al.* Espécies e suscetibilidade antifúngica in vitro de leveduras isoladas em unhas de pacientes com vírus da imunodeficiência humana. **Revista de Ciências Médicas**, [S. l.], v. 18, n. 2, 2012. Disponível em: <https://seer.sis.puc-campinas.edu.br/cienciasmedicas/article/view/646>. Acessado em: 18 fev. 2022.

OLIVEIRA, J. C. **Tópicos em Micologia Médica**. 4 ed. Rio de Janeiro: Control-Lab, 2014.

RODRIGUES, M. L. T. **Avaliação de métodos para testes de suscetibilidade in vitro de enxaguantes bucais frente a espécies do gênero Candida**. 2008. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Farmácia) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2008.

SILVA, A. L. **Potencial da radiação ultravioleta na inibição de fungos leveduriformes e filamentosos**. 2017. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária, Pelotas, 2017.

SIMÕES, J. A. Sobre o diagnóstico da candidíase vaginal. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 27, n. 5, p. 233-234, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-72032005000500001>>. Acessado em: 18 fev. 2022. <https://doi.org/10.1590/S0100-72032005000500001>.

SOARES, L. P. M. A.; OLIVEIRA, R. T.; CARNEIRO, I. C. R. S. Infecções da corrente sanguínea por *Candida* spp. em unidade neonatal de hospital de ensino da Região Norte do Brasil: estudo dos fatores de risco. **Rev Pan-Amaz Saude**, Ananindeua, v. 4, n. 3, p. 19-24, set. 2013. Disponível em <http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232013000300003&lng=pt&nrm=iso>. Acessado em: 18 fev. 2022. <http://dx.doi.org/10.5123/S2176-62232013000300003>.

UNAGUL, P.; ASSANTACHAI, C.; PHADUNGRUENGLUIJ, S.; SUPHANTHARIKA, M.; TANTICHAROEN, M.; VERDUYN, C. Coconut water as a medium additive for the production of docosahexaenoic acid (C22: 6 n3) by *Schizochytrium mangrovei* Sk-02. **Bioresource technology**, v. 98, p. 281-287, 2007.

VIANI, P. R. C. **Candida** provenientes de infecção hospitalar isoladas de pacientes internados em hospital infantil do estado de São Paulo e avaliadas por marcadores fenotípicos. 2007. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, 2007. doi:10.11606/D.42.2007.tde-31012008-113443. Acessado em: 21 abr. 2021.

VIEIRA, Darlene Ana de Paula. FERNANDES, Nayara C. A. **Queiroz. Microbiologia Aplicada**. Inhumas: rede e-Tec Brasil, 2012.

EFEITO DA ADIÇÃO DE ÁGUA DE COCO EM PÓ NO
ENRIQUECIMENTO DE MEIO DE CULTURA PARA *Candida albicans*

*Certifico(amos) que o artigo enviado à **Revista de Ciências Médicas e Biológicas** é um trabalho original, sendo que o seu conteúdo não foi ou não está sendo considerado para publicação em outra revista, seja no formato impresso ou eletrônico*.

Assinaturas

Marcilene da Silva Santos



Exoncelos

Antônio Cláudio de Albuquerque



Valeria Santos Cruz

Maceió, 18 de fevereiro de 2022