

Atividade Antifúngica do Extrato de Folhas de *Psidium guajava* sobre Leveduras do Gênero *Candida*

Antifungal Activity of Leaf Extracts of *Psidium guajava* in *Candida* Species

Joice de Freitas Fonseca¹, Aline do Carmo França Botelho²

Abstract

Candida is an opportunistic pathogen of the oral microbiota of man. Immunological, chemical and mechanical changes can cause disruption of the balance between the fungus and the host which leads to the appearance of candidiasis. The antifungal properties of substances extracted from plants have been reported in studies conducted in several countries, including Brazil, holder of great biodiversity. This study aimed to test the antifungal activity of *Psidium guajava*, in *Candida albicans*, *Candida krusei* and *Candida tropicalis*. The tests were performed from recent cultures of microorganisms. Through the hydroalcoholic macerate of leaf, the crude extract was obtained to be tested on cultures. As controls were used antimicrobials (Fluconazole, mouthwash of *Malva sylvestris* and chlorhexidine gluconate 0.12%). The plant extract inhibited the growth of yeasts, as well as the antimicrobial agents tested, but the presence of fluconazole in *C. tropicalis* did not inhibit their growth. Like mouthwashes, the extract was able to inhibit the growth of the fungus, indicating a view to therapeutic use in cases of oral candidiasis.

Keywords: Antifungal activity; *Psidium guajava*; Candidiasis.

Resumo

Candida é patógeno oportunista integrante da microbiota bucal do homem. Alterações imunológicas, químicas e mecânicas podem ocasionar ruptura do equilíbrio entre o fungo e o hospedeiro e levar ao aparecimento da candidíase. As propriedades antifúngicas de substâncias extraídas de plantas vêm sendo relatadas em pesquisas realizadas em vários países, entre eles, o Brasil, detentor de enorme biodiversidade. Este estudo teve como objetivo testar a atividade antifúngica das folhas de *Psidium guajava*, frente à *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Candida tropicalis*. Os testes foram realizados através de inóculos obtidos a partir de culturas recentes dos microrganismos. Através do macerado hidroalcoólico das folhas obteve-se o extrato bruto para ser testado nas culturas. Como controles foram utilizados antimicrobianos (Fluconazol, antisséptico bucal a base de *Malva sylvestris* e Gluconato de Clorexidina a 0,12%). O extrato da planta inibiu o crescimento das leveduras, assim como os agentes antimicrobianos testados, mas o Fluconazol em presença de *C. tropicalis* não inibiu o seu crescimento. Assim como os antissépticos bucais, o extrato de folhas de goiabeira foi capaz de inibir o crescimento do fungo, indicando uma perspectiva de utilização terapêutica em casos de candidíase bucal.

Palavras-chave: Atividade antifúngica; *Psidium guajava*; Candidíase.

¹ Bióloga egressa do Centro Universitário do Planalto de Araxá (UNIARAXÁ)

² Cirurgiã-dentista e Professora Doutora do Instituto de Ciências da Saúde do Centro Universitário do Planalto de Araxá (UNIARAXÁ)

Correspondência: Aline do Carmo França Botelho
Endereço: Rua Antonio Barreto, 555 – CEP 38184-240, Araxá – MG, Brasil
E-mail: alinecfb@terra.com.br

Data de Submissão: 10/10/2010

Data de Aceite: 25/07/2011

Introdução

O gênero *Candida* é formado por patógenos oportunistas integrantes da microbiota bucal do homem desde o nascimento (BIRMAN, 1998). Alterações imunológicas, químicas, e mecânicas que se processem na cavidade bucal podem favorecer a ruptura do equilíbrio estabelecido entre o fungo e o hospedeiro e levar a candidíase (BOER et al., 2001).

Apesar de o agente mais comum ser *Candida albicans*, outras espécies também têm sido identificadas, como: *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, entre outras. Essas espécies de *Candida* podem ser isoladas das superfícies de mucosas da cavidade oral, da vagina, do trato gastrointestinal e da região retal (SEGAL, 2005).

As propriedades antifúngicas de extratos de plantas medicinais vêm sendo citadas na literatura (MÜLLER; LYMAN; WALSH, 1999; BOER et al., 2005; DIBA et al., 2010). Segundo algumas pesquisas realizadas no Brasil, país detentor de uma grande biodiversidade, a goiaba vermelha, *Psidium guajava*, poderia ser utilizada como alternativa terapêutica em infecções fúngicas (ALVES et al., 2006; ALVES et al., 2009).

P. guajava, além de ser uma fruta muito apreciada nos países tropicais e subtropicais, é amplamente utilizada na medicina popular. Extratos e metabólitos da planta, especialmente os de folhas e frutos, possuem atividades farmacológicas úteis. Apresentam propriedades antiespasmódicas e antimicrobianas no tratamento da diarreia e disenteria. Também tem sido amplamente utilizado como agente hipoglicemiante. Há relato de exibir ação antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória (GUTIÉRREZ; MITCHELL; SOLIS, 2008).

Informações terapêuticas de uso de plantas têm sido acumuladas durante séculos, dessa forma, muitos usuários de plantas medicinais de todo o mundo mantêm em voga a prática do consumo de fitoterápicos. Vários estudos científicos têm sido desenvolvidos para avaliar “in vitro” e “in vivo” as indicações populares de várias plantas medicinais MÜLLER; LYMAN; WALSH, 1999; BOER et al., 2005; ALVES et al., 2006; ALVES et al., 2009; DIBA et al., 2010). O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica “in vitro” do extrato das folhas de *P. guajava* em espécies do gênero *Candida*.

Materiais e Métodos

A obtenção do extrato foi a partir das folhas da goiaba vermelha (*P. guajava* var. *pomifera* L) obtidas no município de Araxá (MG) e identificadas no Laboratório de Botânica do Centro Universitário do Planalto de Araxá (UNIARAXÁ).

A metodologia foi adaptada de Carvalho et al. (2002). Após o procedimento de lavagem e separação, a matéria prima foi levada para secagem em estufa a 33°C durante uma semana para eliminação da umidade e estabilização do conteúdo enzimático, e então a mesma foi reduzida a pó. O extrato foi obtido em água/álcool a 70% na proporção de 50g/200 mL, ou seja, 1:4, submetido à maceração por um período de 72 horas a temperatura ambiente em recipiente âmbar.

As leveduras foram cultivadas em placas contendo o meio nutritivo Agar Sabouraud Dextrose já padronizadas na turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de MacFarland, em solução fisiológica. Os testes foram realizados frente as cepas de *C. albicans* (ATCC 64550), *C. krusei* (ATCC 6258) e *C. tropicalis* (isolamento clínico).

A atividade antifúngica foi determinada pelo método de difusão em meio sólido para determinar o aparecimento de halo de inibição e sua mensuração, incluindo o diâmetro do disco que era de 6mm, de acordo com metodologia adaptada (BAUER; KIRBY, 1966). As zonas de inibição de crescimento foram medidas com paquímetro digital por dois examinadores cegos, previamente calibrados.

Cada disco contido na placa foi embebido com 20 uL da solução do extrato de *P. guajava*. As placas foram incubadas em estufa úmida a 37°C por 24 horas, sendo cada ensaio realizado em duplicata frente a cada cepa selecionada. Os mesmos procedimentos foram realizados com os antimicrobianos controles: Fluconazol - padrão ouro (150 mg - concentração de 1,5mg/ml); Antisséptico bucal com tintura de *Malva sylvestris*, Tirotricina (3 mg), Quinisol (100 mg) e associações; Gluconato de clorexidina a 0,12%. O controle negativo foi composto pelo solvente extrator.

Os dados foram analisados estatisticamente com a utilização do software GraphPad InStat 3.0. Foram feitas análises de variância (ANOVA), sendo as médias consideradas significativas quando o $p < 0,05$.

Resultados

Neste estudo três espécies do gênero *Candida* (*C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis*.) foram testadas frente à solução hidroalcoólica de *P. guajava*. A tabela 1 mostra os resultados da inibição de crescimento referentes aos testes utilizando o extrato da goiabeira e os antimicrobianos. O teste de sensibilidade com a solução hidroalcoólica apresentou atividade antimicrobiana em todas as amostras testadas. O controle negativo, solvente extrator, não apresentou inibição do crescimento dos microrganismos.

Tabela 1. Inibição de crescimento de leveduras do gênero *Candida* pelo extrato da folha de *Psidium guajava* e por antimicrobianos.

Espécies	Diâmetro do halo de inibição (mm)			
	Extrato Bruto de folhas de <i>Psidium guajava</i>	Fluconazol	Antisséptico bucal com <i>Malva sylvestris</i> e associações	Gluconato de clorexidina 0,12%
<i>C. albicans</i>	14	13	41	15
<i>C. krusei</i>	10	13	46	16
<i>C. tropicalis</i>	11	-	41	19

(-) Não houve halo de inibição

Discussão

C. albicans e *C. tropicalis* são as espécies do gênero *Candida* mais patogênicas da cavidade oral e cavidade vaginal, estando presentes em mais de 70% dos isolamentos das infecções fúngicas desta área (ALVES et al., 2006).

O uso contínuo de antimicrobianos contribuiu para o desenvolvimento de resistência por diversos patógenos como o

gênero *Candida*, favorecendo a seleção de microrganismos multiresistentes. Outras espécies do gênero *Candida*, além de *C. albicans*, também vem sendo relatadas como causadoras de infecções e como resistentes a antifúngicos (BERILA; SUBÍK, 2010). Neste estudo, o Fluconazol, amplamente utilizado com antifúngico, não inibiu o crescimento de *C. tropicalis*.

Em muitos países da América Latina, como o Brasil, a fitoterapia constitui em uma terapêutica alternativa econômica em relação aos medicamentos alopáticos disponíveis no mercado, uma vez que caracterizada pela utilização direta de plantas no tratamento de doenças. Neste estudo o extrato bruto utilizando folhas de *P. guajava* demonstrou "in vitro" atividade antimicrobiana, reforçando a indicação popular da planta como antisséptica e corroborando com outro estudo (PESSINI et al., 2003) que analisou treze extratos de diferentes plantas utilizadas na medicina popular brasileira e verificaram que a espécie *Psidium guajava* foi uma das mais ativas frente às leveduras *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*.

Embora tenha sido utilizada uma metodologia diferente, os resultados obtidos aqui foram muito similares aos obtidos em outro trabalho (ALVES et al., 2006), onde a atividade antifúngica foi determinada pelo método de difusão em meio sólido para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) através do macerado hidroalcoólico de folhas de goiabeira contra *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. stellatoidea*.

Entretanto, outro estudo avaliou vários extratos de plantas da Amazônia quanto à inibição de *C. albicans* e verificou que apenas o extrato de *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia) apresentou uma boa atividade antifúngica. Os extratos de *P. guajava* e de *Eleutherine plicata* (marupazinho) apresentaram moderada atividade antifúngica e que os demais extratos testados (*Annona glabra*, *Azadiractha indica*, *Bryophyllum calycinum* e *Mammea americana*) não apresentaram atividade antifúngica (MENEZES et al., 2009).

Nessa investigação, o maior halo de inibição foi referente à *C. albicans*, porém não houve diferença estatística quanto às espécies de *Candida*, indicando que o extrato de *P. guajava* apresentou ampla ação antifúngica.

As três espécies de *Candida* avaliadas apresentaram sensibilidade a clorexidina. Entretanto, vale destacar que com *C. krusei* o halo foi significativamente maior que os das outras espécies, mostrando que a clorexidina é mais efetiva para essa espécie.

Malva sylvestris, planta da família Malvaceae, possui propriedades antiinflamatórias e antissépticas, sendo atualmente empregada na formulação de enxaguatórios e cremes dentais. A malva além de exercer atividade antibacteriana, mostrou-se efetiva na inibição da síntese de glucanos e na atividade antifúngica frente as cepas de *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea* (ALVES et al., 2009).

A solução antisséptica com *Malva sylvestris* utilizada em nosso estudo apresenta uma composição ampla, com vários componentes que, juntos, podem intensificar seu poder antimicrobiano, como foi demonstrado aqui. A solução teve maior desempenho em inibir as leveduras do que os outros antimicrobianos utilizados. Vale salientar que esse antisséptico não foi diluído em água, o que aumenta sua ação antimicrobiana. O uso clínico desse antisséptico, a critério do cirurgião-dentista, pode ser o produto puro ou diluído, dependendo da gravidade das lesões avaliadas durante exame clínico.

O presente estudo mostrou que as espécies do gênero *Candida* foram sensíveis ao extrato de *P. guajava* e a dois antimicrobianos de uso oral, indicando possibilidades terapêuticas frente à candidíase. Uma perspectiva interessante seria a adição do extrato de *P. guajava* a fórmulas tradicionais de enxaguatórios bucais, potencializando seus efeitos antimicrobianos para casos de candidíase bucal.

Conclusão e Considerações Finais

O uso de antimicrobianos nem sempre é efetivo, refletindo a resistência que os microrganismos podem desenvolver frente ao uso indiscriminado desses medicamentos. Os resultados indicaram que há perspectiva de utilização terapêutica do extrato de *P. guajava* em pacientes com candidíase bucal, pois "in vitro" a planta foi capaz de inibir o crescimento de três espécies desse gênero.

O desenvolvimento de novos antissépticos bucais, tendo como componente adicional o extrato de folhas de *P. guajava* pode contribuir para maior eficácia dos mesmos para tratamento da candidíase bucal.

Referências

ALVES, P.M. et al. Atividade antifúngica do extrato de *Psidium guajava* Linn (goiabeira) sobre leveduras do gênero *Candida* da cavidade oral: uma avaliação in vitro. **Rev. Bras. Farmacogn.**, João Pessoa, v. 16, n. 2, p. 192-196, abr./jun. 2006.

ALVES, P.M. et al. Atividade antimicrobiana, antiaderente e antifúngica in vitro de plantas medicinais brasileiras sobre microrganismos do biofilme dental e cepas do gênero *Candida*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Brasília, v. 42, n. 2, p. 222-224, mar./abr. 2009.

BAUER, A.W.; KIRBY, E.M. Antibiotic Susceptibility Testing by Standardized Single Disk Method. **Am. J. Clin. Pathol.**, Philadelphia, v. 45, no. 4, p. 493-496, Apr. 1966.

BERILA, N.; SUBÍK, J. Opportunistic pathogen *Candida glabrata* and the mechanisms of its resistance to antifungal drugs. **Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.**, Praha, v. 59, no. 2, p.67-70, Apr. 2010.

BIRMAN, E.G. Um breve retrospecto sobre *Candida* e candidoses em relação à boca. **Racine**, v.8, n.42, p.56-9, jan./fev., 1998.

BOER, H.J. et al. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trends Microbiol.**, Cambridge, v. 9, no. 7, p.327-335, July 2001.

CARVALHO, A.A. et al. Atividade antimicrobiana in vitro de extratos hidroalcoólico de *Psidium guajava* L. sobre bactérias Gram-negativas. **Acta Farm. Bonaer.**, Buenos Aires, v. 21, n. 4, p. 255-258, oct./dic. 2002.

DIBA, M.A. et al. Chemical composition of fatty acid and unsaponifiable fractions of leaves, stems and roots of *Arbutus unedo* and in vitro antimicrobial activity of unsaponifiable extracts. **J. Nat. Prod. Commun.**, Westerville, OH, v. 5, no. 7, p. 1085-1090, July 2010.

GUTIÉRREZ, R.M.; MITCHELL, S.; SOLIS, R.V.J. *Psidium guajava*: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. **J. Ethnopharmacol.**, Limerick, v. 17, no. 1, p. 1-27, Apr. 2008.

MENEZES, T.O.A. et al. Avaliação in vitro da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos de plantas da região amazônica sobre cepa de *Candida albicans*. **Rev. Odontol. UNESP**, Marília, v. 38, n. 3, p.184-191, 2009.

MÜLLER, F.M.; LYMAN, C.A.; WALSH, T.J. Antimicrobial peptides as potential new antifungals. **Mycoses**, Berlin, v. 42, Suppl. 2, p. 77-82, 1999.

PESSINI, G.L. et al. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizadas na medicina popular. **Rev. Bras. Farmacogn.**, Maringá, v. 13, Supl. 1, p. 21-24, 2003.

SEGAL, E. *Candida* still number one – what do we know and where we going from there? **Mycoses**, Berlin, v. 48, Suppl. 1, p. 3-11, 2005.