



## Atividade antifúngica do extrato de *Psidium guajava* Linn. (goiabeira) sobre leveduras do gênero *Candida* da cavidade oral: uma avaliação *in vitro*

Pollianna M. Alves<sup>1\*</sup>, Pedro H.A.S. Leite<sup>2</sup>, Jozinete V. Pereira<sup>2</sup>, Luciana F. Pereira<sup>3</sup>, Maria S. V. Pereira<sup>3</sup>, Jane S. Higino<sup>4</sup>, Edeltrudes O. Lima<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Odontologia da UFPB, Universidade Federal da Paraíba, Campus I, Cidade universitária, 58051-900, João Pessoa, PB, Brasil,

<sup>2</sup>Departamento de Odontologia da UEPB, Universidade Estadual da Paraíba, Campus Universitário de Bodocongó, 58109-753, Campina Grande, PB, Brasil,

<sup>3</sup>Departamento de Biologia Molecular, Universidade Federal da Paraíba, Campus I, Cidade Universitária, 58059-900, João Pessoa, PB, Brasil,

<sup>4</sup>Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Arthur de Sá s/n, Cidade Universitária, 50740-521, Recife, PE, Brasil,

<sup>5</sup>Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba, Campus I, Castelo Branco, 58051-900, João Pessoa, PB, Brasil

**RESUMO:** O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica do extrato da folha de *Psidium guajava* Linn. sobre leveduras do gênero *Candida*, isoladas da cavidade oral, incluindo *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. stelatoidea* e *C. krusei*, em análise comparativa com o gluconato de clorexidina à 0,12%. Os ensaios antifúngicos foram realizados pelas técnicas de difusão em meio sólido para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). A CIM do extrato de *Psidium guajava* sobre *C. albicans* e *C. tropicalis* foi de 1:32, *C. stelatoidea* e *C. krusei* de 1:2, formando, em média, halos de inibição entre 11 e 22 mm. Diante dos resultados, conclui-se que o extrato da folha de *Psidium guajava* (goiabeira) apresenta a capacidade de inibir o crescimento de leveduras do gênero *Candida* da cavidade oral, o que sugere a possibilidade de utilização deste extrato como meio alternativo no tratamento das candidose orais.

**Unitermos:** *Psidium guajava*, *Candida*, atividade antifúngica.

**ABSTRACT:** "Antifungal activity of the extract of *Psidium guajava* Linn. ("goiabeira") upon leavens of *Candida* of the oral cavity: an *in vitro* evaluation". The present study evaluated the antifungal *in vitro* activity of the extract of the leaf of *Psidium guajava* Linn. against leavens of *Candida* of the oral cavity, including *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. stelatoidea* and *C. krusei*, in comparative study with chlorhexidine (0,12%). The tests were carried out by agar-diffusion technique in dishes to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC). The MIC of the extract of *Psidium guajava* upon *C. albicans* and *C. tropicalis* was 1:32, *C. stelatoidea* and *C. Krusei* was 1:2, making, in average, inhibition halos between 11 and 22 mm. It can be concluded that the extract of *Psidium guajava* show potential to inhibit the growth of leavens of *Candida* of the oral cavity, it supports the possibility of the use of this extract as an alternative way in the oral candidosis treatment.

**Keywords:** *Psidium guajava*, *Candida*, antifungal activity.

### INTRODUÇÃO

A Candidose oral é uma infecção causada pela levedura do gênero *Candida*, a qual vive comumente na boca de indivíduos aparentemente saudáveis. A *Candida* é um microrganismo saprófito, que, na dependência de fatores predisponentes, que alteram a integridade orgânica, modificam a sua conformação leveduriforme para uma forma fusiforme, tornando-se patogênico (Amato Neto, 1995; Ramos et al., 1999).

Na microbiota normal da boca a *Candida albicans* é o comensal evidenciado com maior frequência

atingindo até 70% do total de isolamentos (Jorge et al., 1997; Nery et al., 1994). Esta levedura tem um papel relevante no desencadeamento de infecções bucais, porém espécies consideradas patogênicas como *C. kefir*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. stelatoidea*, entre outras têm sido detectadas em casos de candidose bucal, principalmente naqueles relacionados a imunossupressão (Anaissie, 1992; Challacombe, 1994; Lima et al., 1994; Lynch, 1994).

Segundo Greenspan (1994), 41% dos pacientes com AIDS apresentaram candidose no estágio inicial da doença, outros autores como, Ramos et al. (1999)

verificaram a presença da candidose em 70% sendo não só um importante indicador de comprometimento imunológico, mas também, a complicação micótica mais comum entre os HIV-positivos, podendo preceder o aparecimento da candidose esofágica e do trato gastrointestinal.

Em relação ao tratamento da candidose, vários agentes antifúngicos de uso tópico e sistêmico são utilizados de acordo com o quadro clínico e estado geral do paciente (Martins; Lacaz, 1980; Cury et al., 1977). A clorexidina é amplamente empregada através de bochechos, géis e pastilhas (Fowler; Jones, 1992). Candido et al. (1996) demonstraram *in vitro* a atividade antifúngica do Cepacol, da Malvona e do Periogard, e observaram que a clorexidina foi a substância mais eficaz, a qual inibiu todas as cepas de *Candida albicans* analisadas. Pedroso et al. (2004) acrescentaram que a atividade antifúngica da clorexidina frente a *Candida albicans* é concentração dependente.

No entanto, devido a ocorrência de fatores indesejáveis como o surgimento de resistência de algumas cepas aos antifúngicos convencionais, principalmente em indivíduos imunodeprimidos, e, em caráter geral, a presença de efeitos tóxicos destes (Crissey et al., 1995), o estudo de plantas com propriedades terapêuticas, abrangendo aquelas com atividade antimicrobiana tem crescido bastante, não apenas por constituir-se em recurso terapêutico alternativo, mas ainda devido às perspectivas de isolar substâncias que apresentem eficácia significativa e menor índice de desvantagens (Recio et al., 1989). Um número satisfatório de produtos vegetais da região nordeste exibe substâncias com atividade antifúngica sobre leveduras de *Candida*, podendo atuar seletivamente

sobre estes microrganismos (Minami; Oliveira, 1986; Michelin et al., 2005).

Queiroz (1998) demonstrou que os extratos do *Anacardium occidentale*, *Plectranthus amboinicus*, *Punica granatum* e *Pithecellobium avaremotemo* e o óleo essencial da *Lippia sidoides* revelaram boa atividade antifúngica ante 14 cepas de leveduras do gênero *Candida*. Santos et al. (2002) avaliaram o efeito do extrato etanólico de própolis sobre o crescimento *in vitro* de *Candida albicans* coletada de pacientes brasileiros HIV - positivos e HIV - negativos portadores de candidose oral, e observaram que a própolis também tem alta eficácia na inibição desta levedura.

Os testes de sensibilidade *in vitro*, para fungos, não têm sido empregados rotineiramente, contudo, eles são de grande importância para a verificação de resistência destes microrganismos, para o controle da terapêutica antimicótica e para pesquisa de novas substâncias alternativas para o tratamento, como por exemplo, a utilização de extratos vegetais. (Cury et al., 1989; Souza et al., 1990; Oliveira et al., 2006).

A planta *Psidium guajava*, conhecida popularmente como goiabeira, se apresenta na natureza em forma de arbusto perene da família das Mirtáceas. É uma árvore frutífera, originária das Américas Central e do Sul, cultivada em todos os países de clima tropical. Na medicina popular é utilizada para cólicas, colite, diarreia, disenteria e dor de barriga (Vendruscolo et al., 2005; Tôrres et al., 2005) Suas folhas apresentam a seguinte composição química: taninos (9-10%), óleo essencial (90,3%) rico em cariofileno, nerolidiol,  $\beta$ -bisaboleno, aromadendreno, p-selinemo,  $\alpha$ -pinemo e 1,8-cineol; triterpenóides (ácido oleanólico, ursólico, catecólico,

**Tabela 1.** Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato da folha da *Psidium guajava* sobre as leveduras de *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida stelatoidea* e *Candida krusei*.

Espécies fúngicas	Diâmetro dos halos de inibição (mm)					
	Concentração do extrato (mg/mL)					
	EP	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
<i>C. albicans</i>	22	20	18	16	12	11
<i>C. tropicalis</i>	21	20	19	16	15	12
<i>C. stelatoidea</i>	13	12	0	0	0	0
<i>C. krusei</i>	14	12	0	0	0	0

EP=Extrato Puro

**Tabela 2.** Concentração Inibitória Mínima (CIM) do gluconato de clorexidina à 0,12% sobre as leveduras de *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida stelatoidea* e *Candida krusei*.

Espécies fúngicas	Diâmetro dos halos de inibição (mm)					
	Concentração do extrato (mg/mL)					
	SD	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
<i>C. albicans</i>	17	15	14	12	11	0
<i>C. tropicalis</i>	17	16	14	13	12	0
<i>C. stelatoidea</i>	22	20	18	15	13	0
<i>C. krusei</i>	21	18	15	14	0	0

SD=Sem Diluição

guaiavólico, maslínico),  $\beta$ -sitosterol. O caule possui taninos numa concentração de 12 a 30% (Alonso, 1998). Sato et al. (2000), pesquisando a atividade antifúngica de extratos de plantas para assepsia e esterilização, encontraram atividade antimicótica de *Psidium guajava* frente a *Aspergillus fumigatus* M008. Pessini et al. (2003) analisaram 13 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*.

Tendo em vista a elevada frequência e importância clínica atribuída às candidoses orais e considerando a relevância de se verificar a eficácia de meios terapêuticos alternativos, através das plantas medicinais encontradas na nossa região, partindo do conhecimento popular, consideramos ser de grande importância avaliar *in vitro* a atividade antifúngica, através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato da folha da *Psidium guajava* Linn. (goiabeira), em estudo comparativo com o gluconato de clorexidina à 0,12%, sobre leveduras de *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. stelatoidea*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Local do estudo

A pesquisa experimental foi realizada no Laboratório de Genética de Microrganismos do Departamento de Biologia Molecular do Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN) da Universidade Federal da Paraíba.

### Material botânico e obtenção da matéria prima

Foi estudada a folha da goiabeira (*Psidium guajava* Linn.). O material botânico foi obtido no mercado público central de João Pessoa - PB, e identificado botanicamente no Laboratório de Toxicologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPE (Universidade Federal de Pernambuco - Recife). As folhas foram lavadas com água e posteriormente separadas as matérias-primas a serem utilizadas na pesquisa. Em seguida a matéria-prima foi levada à secagem em estufa a 33 °C, durante uma semana, para eliminação de umidade e estabilização do conteúdo enzimático. Passado este período a matéria-prima foi retirada da estufa, triturada a pó em moinho elétrico e então submetida a processo de extração dos princípios ativos.

### Extração dos marcadores químicos

O método de extração empregado foi a lixiviação ou percolação em fluxo contínuo à temperatura ambiente. Por se tratar de uma matéria rica em polifenóis de fácil modificação estrutural, não foi utilizada a extração à

quente, preservando assim a estabilidade do material. Na lixiviação em fluxo contínuo utilizou-se um processo onde existe a renovação constante da solução extratora (solução hidroalcoólica a 80% v/v) durante um período de 24 horas. Decorrido este tempo o marco fica completamente esgotado (extração total dos marcadores ou princípios ativos). Nesta etapa, foram utilizados aproximadamente 8 litros de solução hidroalcoólica para 1 kg de matéria prima seca e pulverizada, visando o completo esgotamento da droga. Recuperou-se um volume de aproximadamente 6.600 mL de cada extrato, que após filtração para retirada das impurezas foram acondicionados em frascos âmbar, limpos, secos e estocados em câmara fria.

### Concentração da solução extrativa (lixiviado)

A etapa seguinte foi a concentração da solução em nível de extrato fluido 1:1 (p/v). O procedimento para a concentração do extrato foi realizado em rota-vapor (Modelo Ika-Werk) a uma temperatura constante de 45°, por motivo anteriormente descrito. O extrato obtido apresentou um pH ligeiramente ácido, em torno de 4,7.

Os procedimentos de extração e concentração dos extratos hidroalcoólicos foram realizados no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

### Espécies fúngicas

Foram utilizadas as cepas de *C. albicans* (24), *C. tropicalis* (25), *C. stelatoidea* (23) e *C. krusei* (9), isoladas e identificadas no Laboratório de Micologia e posteriormente reativadas no Laboratório de Genética de Microrganismos, ambos lotados na Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

### Determinação da atividade antifúngica

A atividade antifúngica foi determinada pelo método de difusão em meio sólido para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), através do método proposto por McGinnis (1980). As leveduras foram cultivadas em caldo nutritivo (ASD - Ágar Sabouraud Dextrose à 2% - DIFCO) e incubadas a 37 °C por 24 horas em estufa bacteriológica, obtendo-se um inóculo de 10<sup>5</sup> UFC/mL. Posteriormente, os crescimentos das leveduras foram difundidos nas placas de Petri na concentração de 10<sup>-1</sup>. Foram realizadas perfurações, de aproximadamente 6 mm de diâmetro, no meio de cultura (ASD - Ágar Sabouraud Dextrose à 2% - DIFCO), depositado em placas de Petri. Nos orifícios foi colocado um volume de 50  $\mu$ L da solução da escala do extrato diluído, variando da diluição 1:1 até 1:32, em água estéril. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por um período de 24-72 horas. Cada ensaio foi realizado em duplicata frente a cada cepa selecionada. O mesmo procedimento também foi

realizado com o gluconato de clorexidina à 0,12%. Foi considerada como CIM a menor concentração do extrato que inibiu completamente o crescimento microbiano.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da atividade antifúngica da folha de *Psidium guajava* sobre *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. stelatoidea* e *C. krusei* mostram uma diminuição proporcional do diâmetro dos halos de inibição à medida que a concentração do extrato foi diminuída (Tabela 1).

Pode-se observar, semelhantemente, proporcionalidade entre a diminuição do diâmetro dos halos e a diminuição da concentração do extrato do gluconato de clorexidina à 0,12% (Tabela 2).

O extrato da folha da goiabeira apresentou excelentes resultados, inibindo o crescimento de todas as cepas analisadas. *C. albicans* e *C. tropicalis* foram inibidas até a concentração de 1:32. Já as leveduras *C. stelatoidea* e *C. krusei* apresentaram sensibilidade apenas nas maiores concentrações (1:2) (Tabela 1). A clorexidina, droga padrão, inibiu *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. stelatoidea* na concentração de 1:16, e *C. krusei* na concentração de 1:8 (Tabela 2).

Cárceres et al. (1991) relatam que a goiabeira apresenta atividade antimicótica, através do macerado hidroalcoólico de suas folhas contra *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida stellatoidea*, fato este também comprovado neste nosso experimento *in vitro*, visto que, na concentração de 1:32 inibiu 50% das cepas analisadas (*C. albicans* e *C. tropicalis*) e na concentração de 1:2 inibiu também os outros 50% das cepas (*C. stelatoidea* e *C. krusei*). Ou seja, a folha da goiabeira mostrou atividade em todas as cepas (100%) estudadas. Resultados estes de grande valia, pois se sabe que *C. albicans* e *C. tropicalis* são as espécies do gênero *Candida* mais patogênicas da cavidade oral, estando presentes em mais de 70% dos isolamentos das infecções fúngicas desta área.

## CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados, pode-se concluir que o extrato da folha da *Psidium guajava* apresentou atividade antifúngica bastante satisfatória sobre as leveduras de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. stelatoidea* e *C. krusei*. Considerando que a *Psidium guajava* (goiabeira) é de fácil acesso à população e o extrato é de baixo custo, a folha da goiabeira pode ser utilizada topicamente como meio alternativo no tratamento da candidose oral. Entretanto, avaliações farmacológicas mais abrangentes deverão ser desenvolvidas, considerando a dinâmica do corpo humano como um todo, assim como a existência de fatores sistêmicos na flora oral.

## REFERÊNCIAS

- Alonso T 1998. *Tratado de Fitomedicina: bases clínicas y farmacológicas*. Buenos Aires: ISIS Ediciones SRL.
- Amato Neto V 1995. *Síndrome da imunodeficiência adquirida: informações básicas*. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
- Anaissie E 1992. Opportunistic mycoses in the immunocompromised host: Experience at a cancer center and review. *CID* 14: 43-53.
- Candido RC, Azevedo RV, Ito IY 1996. Determinação da concentração inibitória mínima de cepacol, malvona e periogard, ante a *Candida albicans* isoladas da cavidade bucal. *Rev Odontol UNESP* 25: 79-84.
- Challacombe SJ 1994. Immunologic aspects of oral candidiasis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 78: 202-210.
- Crissey JT, Lang H, Parish LC 1995. *Manual of medical mycology*. Cambridge: Blackwell Science.
- Cury AE, Minami PS, Parra DS 1977. Sensibilidade *in vitro* de leveduras do gênero *Candida* à violeta de genciana. *Rev Microbiol* 8: 84-88.
- Cury AE, Miche MP, Minami PS 1989. Leveduras isoladas de pacientes com câncer: incidência e sensibilidade a antibióticos poliênicos. *Rev Microbiol* 20: 102-107.
- Fowler CM, Jones DP 1992. Modified adherence of *Candida albicans* to human bucal epithelial cells *in vitro* following treatment with cationic, non-cationic antimicrobial agents. *Int J Pharm* 86: 193-199.
- Greenspan D 1994. Treatment of oral candidiasis in HIV infection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 9: 211-215.
- Jorge AOC, Koga Ito GY, Gonçalves CR 1997. Presença de leveduras do gênero *Candida* na saliva de pacientes com diferentes fatores predisponentes e de indivíduos controle. *Rev Odontol Univ São Paulo* 11: 279-285.
- Lima EO, Figueiredo RB, Sampaio MCC 1994. Isolamento e identificação de leveduras da cavidade bucal. *CCS* 12: 61-63.
- Lynch DP 1994. Oral candidiasis: history, classification and clinical presentation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 78: 189-193.
- Martins ER, Lacaz CS 1980. Terapêutica das candidíases. In: Lacaz CS. *Candidíases*. São Paulo: USP, p.178-189.
- McGinnis MR 1980. *Laboratory handbook of medical mycology*. New York: Academic Press, p.411-416.
- Michelin DC, Moreschi PE, Lima AC, Nascimento GGF, Paganelli MO, Chaud MV 2005. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. *Rev Bras Farmacogn* 15: 316-320.
- Minami OS, Oliveira F 1986. Atividade antifúngica de *Bidens pilosa* L. *Rev Bras Farmacogn* 1: 118-122.
- Nery EO, Gonçalves CR, Shimizu MT, Unterkircher CS, Fantinato V, Jorge AOC 1994. Influência dos antígenos do sistema ABO (H) na saliva sobre a presença do gênero *Candida* na cavidade bucal. *Rev Odontol Univ São Paulo* 81: 37-41.
- Oliveira RAG, Lima EO, Vieira WL, Freire KRL, Trajano VN, Lima IO, Souza EL, Toledo MS, Silva-Filho RN 2006. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. *Rev Bras Farmacogn* 16: 77-82.
- Pedroso MAG, Gala-Garcia A, Santos VR, Cortes ME 2004. Efetividade do gel de clorexidina frente a *Candida albicans* *in vitro*. *Pesq Odontol Bras* 18: 217.
- Pessini GL, Holetz FB, Sanches NR, Cortez DAG, Dias-Filho

- BP, Nakamura CV 2003. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. *Rev Bras Farmacogn 13(Supl. 1)*: 21-24.
- Queiroz MVF 1998. *Atividade antifúngica in vitro de plantas medicinais frente a leveduras do gênero Candida isoladas da cavidade bucal*. João Pessoa, 98f. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-graduação em Odontologia, Universidade Federal da Paraíba.
- Ramos INC, Vasconcelos LCS, Lima MGGC, Figueiredo RLQ 1999. Candidose Bucal em pacientes HIV-positivos. *JBC 3*: 59-61.
- Recio MC, Rios JL, Villar A 1989. A review of some antimicrobial compounds isolated from medicinal plants reported in the literature 1978-1988. *Phytother Res 3*: 117-125.
- Santos VR, Mesquita RA, Senna MIB, Martins RS, Pereira ES, Lima Júnior SM 2002. Efeito do extrato etanólico de própolis comercial sobre o crescimento *in vitro* de *Candida albicans* coletados de pacientes brasileiros HIV - positivos e HIV - negativos portadores de candidose bucal. *Jornal do CROMG 134*: 4.
- Sato J, Goto K, Nanjo F, Kawai S, Murata K 2000. Antifungal activity of plant extracts against *Arthrimum sacchari* and *Chaetomium funicola*. *J Biosci Bioeng 90*: 442-446.
- Souza BEM, Paula CR, Purcho AGV, Correa B, Cury AE 1990. Aspectos morfofisiológicos, fatores de virulência e sensibilidade a antifúngicos de amostras de *Candida albicans*, sorotipos A e B, isoladas em São Paulo, Brasil. *Rev Microbiol 21*: 247-253.
- Tôres AR, Oliveira RAG, Diniz MFFM, Araújo EC 2005. Estudo sobre o uso de plantas medicinais em crianças hospitalizadas da cidade de João Pessoa: riscos e benefícios. *Rev Bras Farmacogn 15*: 373-380.
- Vendruscolo GS, Rates SMK, Mentz LA 2005. Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. *Rev Bras Farmacogn 15*: 361-372.