Revista Multidisciplinar do Nordeste Mineiro, v.13, 2023
ISSN 2178-6925

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO EXTRATO HEXÂNICO DE *Psidium guineense* (Myrtaceae) CONTRA CEPAS DE *Candida glabrata e Candida parapsilosis.*

ANTIFUNGAL ACTIVITY OF THE HEXANIC EXTRACT OF *Psidium guineense* (Myrtaceae) AGAINST *Candida glabrata* and *Candida parapsilosis*.

Fernanda Sthéfanie Medeiros de Araújo
Graduanda em Odontologia
Universidade Federal de Campina Grande, Patos/PB, Brasil
E-mail: fernanda.sjs77@gmail.com

Pedro Odon Almeida Silva
Graduando em Odontologia
Universidade Federal de Campina Grande, Patos/PB, Brasil
E-mail: pedroodon26@gmail.com

Lara Mayanne Moreira de Oliveira Nóbrega
Graduanda em Odontologia
Universidade Federal de Campina Grande, Patos/PB, Brasil
E-mail: laramayanne3@gmail.com

Abrahão Alves de Oliveira Filho
Doutor em Farmacologia
Universidade Federal de Campina Grande, Patos/PB, Brasil
E-mail: abrahao.alves@professor.ufcg.edu.br

Yanna Carolina Ferreira Teles
Doutora em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos
Universidade Federal da Paraíba, Areia/PB, Brasil
E-mail: yannateles@gmail.com

Edeltrudes de Oliveira Lima
Doutora em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa/PB, Brasil
E-mail: edelolima@yahoo.com.br

RESUMO

A candidíase é uma infecção fúngica oportunista causada por microrganismos do gênero *Candida*, a mais comum da cavidade oral. Os fungos *Candida* estão presentes na microbiota oral saudável, entretanto condições podem torná-los patogênicos. Diversos medicamentos antifúngicos vêm sendo utilizados para o tratamento da candidíase, tais como, antifúngicos azóis (cetoconazol, fluconazol) e antifúngicos poliênicos (nistatina, anfotericina B), no entanto, diversos desafios têm sido observados quanto à eficácia do tratamento medicamentoso como: a resistência das cepas fúngicas aos antimicóticos, adesão do paciente, efeitos adversos dos medicamentos sintéticos. Assim, o uso de plantas medicinais apresenta-se como uma alternativa viável e promissora para a descoberta de novos agentes fitofármacos de grande potencial biológico. Embasado em estudos da literatura que evidenciam as caraterísticas físico-químicas e etnofarmacológicas das espécies de plantas medicinais, esta pesquisa tem por objetivo avaliar a atividade antifúngica do extrato hexânico de *Psidium guineense* (*Myrtaceae*). O estudo se dá através da realização de ensaios *in vitro* onde foi utilizado como substância-teste o extrato hexânico de *Psidium guineense* frente as espécies fúngicas de *Candida glabrata* e *Candida parapsilosis* previamente identificadas e mantidas em meios de cultura de ágar Sabouraud dextrose – ASD e caldo Sabouraud dextrose – CSD. Ademais, para realização do controle positivo foi empregado a nistatina como antifúngico padrão. Por conseguinte, foi realizada a técnica de microdiluição em caldo para determinação da Concentração inibitória mínima (CIM) do extrato hexânico de *Psidium guineense*. A leitura da CIM foi feita em 48 horas. Como resultado desse estudo, foi possível identificar que para ambas as cepas da espécie do gênero *Candida*, o extrato hexânico de *Psidium guineense* apresentou valor de CIM superior a 1024 µg/mL. Sendo assim, observa-se que a substância teste em questão apresenta-se ineficaz contra as cepas de fungos testadas por meio da metodologia utilizada, no entanto necessita de mais estudos para verificar o potencial antifúngico contra outras cepas de fungos.

Palavras-chaves: Farmacologia; Fitoterapia; Odontologia.

ABSTRACT

Candidiasis is an opportunistic fungal infection caused by microorganisms of the genus *Candida*, the most common in the oral cavity. *Candida* fungi are present in the healthy oral microbiota, but conditions can make them pathogenic. Various antifungal drugs have been used to treat candidiasis, such as azole antifungals (ketoconazole, fluconazole) and polyene antifungals (nystatin, amphotericin B). However, several challenges have been observed with regard to the efficacy of drug treatment, such as resistance of fungal strains to antimycotics, patient compliance and adverse effects of synthetic drugs. Thus, the use of medicinal plants is a viable and promising alternative for the discovery of new phytopharmaceutical agents with great biological potential. Based on studies in the literature showing the physicochemical and ethnopharmacological characteristics of medicinal plant species, the aim of this research is to evaluate the antifungal activity of the hexanic extract of *Psidium guineense (Myrtaceae).* The study was carried out through *in vitro* tests in which the hexanic extract of *Psidium guineense* was used as a test substance against the fungal species *Candida glabrata* and *Candida parapsilosis*, which had been previously identified and maintained in Sabouraud dextrose agar (SDA) and Sabouraud dextrose broth (SSB) culture media. In addition, nystatin was used as the standard antifungal agent for the positive control. The broth microdilution technique was then used to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the hexanic extract of *Psidium guineense*. The MIC was read after 48 hours. As a result of this study, it was possible to identify that for both strains of the *Candida* genus, the hexanic extract of *Psidium guineense* showed a MIC value of more than 1024 µg/mL-1. This means that the test substance in question is ineffective against the strains of fungi tested using the methodology used, but further studies are needed to verify its antifungal potential against other strains of fungi.

Keywords: Pharmacology; Phytotherapy; Dentistry.

1 INTRODUÇÃO

Os fungos *Candida* vivem em relação comensal inofensiva com o hospedeiro e podem colonizar diferentes habitats como mucosas e pele dos seres humanos, sendo

o trato gastrointestinal, desde a boca até o reto, o principal sítio de colonização. Estão presentes na microbiota oral saudável, entretando condições podem favorecer seu crescimento e torná-los patogênicos, tais como: redução do fluxo salivar, deficiência vitamínica, fumo, terapias com antibióticos de largo espectro e presença de doenças imunossupressoras (Brandão *et al*., 2021).

A candidíase é uma infecção fúngica oportunista causada por microorganismos do gênero *Candida*, o qual apresenta cerca de 200 espécies distintas de leveduras, sendo os principais agentes de acometimento humano as espécies *C. albicans, C. tropicalis, C. parapsilosis, C. glabrata* e *C. krusei*. A espécie *C. albicans* é a mais incidente em infecções pelo gênero. No entanto, o número de relatos de infecções causadas por espécies de Candida não-albicans, como *C. Glabrata* é crescente (Nunes, 2017).

Para que consigam se proliferar e infectar, os microoganismos precisam ultrapassar/superar a imunidade inata e adquirida, além de barreiras naturais do hospedeiro: mecânica (pele), bioquímicas e físico-químicas (pH extremos e produção de muco). Os fatores de virulência do gênero *Candida* são inúmeros: secreção de enzimas hidrolíticas, expressão de adesinas e invasinas, tigmotropismo, bomba de efluxo, formação de biofilme. Destacando-se a morfologia celular dessas espécies como um dos principais, visto que a formação de hifas, está diretamente relacionada a capacidade de invasão tecidual, enquanto a forma leveduriforme está associada a adesão a célula do hospedeiro (Rocha *et al*., 2021).

A transição da *Candida* de uma relação comensal inofensiva com o hospedeiro para um estado patogênico parasitário é dependente de uma variação de fatores. Podem ser eles locais como má higiene e uso prolongado de próteses, tabagismo, disfunção salivar ou sistêmicos, como discrasias sanguíneas, deficiências nutricionais e a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). A candidíase oral está fortemente relacionada à infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). Relatos epidemiológicos enfatizam a prevalência da candidíase em pacientes HIV positivos e sua importância como marcador da progressão da doença e preditivo para o aumento da imunodepressão (Vila *et al*., 2020).

A infecção fúngica causada pela *Candida* também é muito recorrente em pacientes submetidos a tratamentos antineoplásicos, visto que as drogas quimioterápicas causam imunodepressão no paciente. A candidíase apresenta-se sob diferentes formas: a pseudomembranosa, caracterizada pela formação de placa

esbranquiçada removida à raspagem; a forma crônica hiperplásica, que exibe o aspecto de placa esbranquiçada não destacável a raspagem; a candidíase eritematosa, caracterizada pela presença de eritema local ou difuso; e a queilite angular, constituída por lesões eritematosas e/ou ulceradas nas comissuras labiais (Pereti; Maza, 2021).

Para tratar as lesões causadas pela candidíase é necessário inicialmente identificar fatores predisponentes e corrigí-los, exemplo de pacientes usuários de prótese, orientar sobre a higiene e a não utilizá-la continuamente. Na ausência de fatores óbvios, ou frente a casos de lesões muito disseminadas, indica-se avaliação sistêmica por meio de hemograma, glicemia em jejum e anti-HIV, a fim de descartar quadros de anemia e imunossupressão, associada ou não ao HIV. É importante salientar que vários medicamentos sintéticos estão sendo desenvolvidos para tratar a candidíase oral, como antissépticos à base de iodoquinol, derivados sulfamídicos, quinonas e antifúngicos poliênicos (nistatina e anfotericina B). Além desses, destacam-se ainda os antifúngicos azóis que são agentes do imidazol (cetoconazol e clotrimazol) e os agentes triazóis (fluconazol e itraconazol). Entretanto, o uso indiscriminado de antifúngicos tem gerado uma resistência maior de diversos microrganismos, fazendo com que os profissionais busquem outras alternativas efetivas, como a fitoterapia e a terapia fotodinâmica (Borges *et al*., 2021).

A utilização da fitoterapia contra infecções fúngicas se mostrou uma alternativa promissora ao longo dos anos, devido à sua ação antimicrobiana e antiinflamatória, menor toxicidade, redução no desenvolvimento de cepas resistentes, biocompatibilidade e baixo custo. Entretanto, essa utilização deve estar embasada em estudos científicos, sua posologia e modo de administração (Uguña; León; Chacha, 2017).

Em meio as diversas plantas de uso medicinal destaca-se a família *Myrtaceae* que compreende diversos gêneros e espécies de árvores e arbustos, distribuídos em todos os domínios fitogeográficos brasileiros. Nesta família está presente o gênero *Psidium* e a espécie *Psidium guineense*, conhecida popularmente como araçá-do-campo. Estudos da atividade biológica desta planta têm demonstrado propriedades antimicrobianas de extratos de folhas e o potencial antioxidante dos frutos. Além das propriedades do óleo essencial das folhas de *P. guineense*, antioxidantes, anti-inflamatórias, antiproliferativas e antimicobacterianas (Nascimento *et al*., 2017).

Assim, baseada na necessidade de um maior conhecimento científico sobre a

fitoterapia, principalmente relacionada ao tratamento da candidíase oral, esse trabalho vai investigar a possível atividade antifúngica do extrato hexânico de *Psidium guineense (myrtaceae)* contra cepas do gênero *Candida*.

2 METODOLOGIA E VIABILIDADE

2.1 ENSAIO *IN VITRO*

2.1.1 SUBSTÂNCIA-TESTE

Para o ensaio foi utilizado o extrato hexânico das folhas de *Psidium guineense*, que foram cedidos pela equipe da Profª. Dra. Yanna Carolina Ferreira Teles, da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

O extrato foi conservado em frasco de vidro âmbar e mantido sob refrigeração. As emulsões do extrato nas diferentes concentrações foram preparadas no momento de execução do ensaio. Em um tubo de ensaio esterilizado, foi adicionado 60.000 µg do extrato, 0,15 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), 0,06 mL de Tween 80 (INLAB/Indústria Brasileira) e quantidade suficiente para 3 mL de água destilada estéril. A mistura foi agitada por 5 minutos em aparelho Vortex (Fanem), obtendo uma emulsão com concentração de 20.000 µg/mL do extrato, 5% de DMSO e 2% de Tween 80. E através de diluições em água destilada ou no próprio meio de cultura foi obtida a concentração desejada do extrato. A pesquisa seguiu as normas do CGEN-Conselho de Gestão do Patrimônio Genético, cadastrado na plataforma SISGEN.

2.1.2 ESPÉCIES FÚNGICAS

Foram utilizadas cepas de *Candida glabrata* (LM06, LM 17, LM 116, LM302) e cepas de *Candida parapisilosis* (ATCC 22019, LM 04, LM 09, LM 14 e LM 02), disponíveis no Laboratório de Microbiologia da Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas(UACB)/CSTR/UFCG.

Todas as cepas foram mantidas em ágar Sabouraud dextrose (ASD) a uma temperaturade 4°C, sendo utilizados para os ensaios repiques de 24 horas em ASD incubados a 35 °C. No estudo da atividade antimicrobiana foi utilizado um inóculo fúngico de aproximadamente 1 - 5 x 10^6 UFC/mL padronizado de acordo com a turbidez do tubo 0,5 da escala de McFarland (Cleeland; Squires, 1991; Hadacek, Greger, 2000).

2.1.3 MEIOS DE CULTURA

Foram utilizados os meios ágar Sabouraud dextrose - ASD (Difco Lab., USA) para manutenção dos micro-organismos; e caldo Sabouraud dextrose - CSD (Difco Lab., USA) para os ensaios in vitro; preparados conforme as instruções do fabricante.

2.1.4 FÁRMACO ANTIFÚNGICO

Foi utilizado como antifúngico padrão (controle positivo), a nistatina em pó (Pharma Nostra, Rio de Janeiro). As soluções foram preparadas no momento de execução dos testes, para alcance das concentrações desejadas.

2.1.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A concentração inibitória mínima do extrato de *Psidium guineense* foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo (Cleeland; Squires, 1991; Hadacek, Greger, 2000). Foram utilizadas placas de 96 orifícios estéreis e com tampa. Em cada orifícioda placa, foi adicionado 100 µL do meio líquido caldo Sabouraud dextrose duplamente concentrado. Em seguida, 100 µL da emulsão do extrato na concentração inicial de 2048 µg/mL (também duplamente concentrado), foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa. E por meio de uma diluição seriada em razão de dois, foram obtidas as concentrações de 1024,512, 256, 128, 64, 32, 16, 8 e 4 µg/mL, de modo que na primeira linha da placa encontra-se a maior concentração e na última, a menor concentração. Por fim, foi adicionado 10 µL do inóculo de aproximadamente 1-5 x 10^6 UFC/mL das espécies fúngicas nas cavidades, onde cada coluna da placa refere-se a uma cepa fúngica, especificamente. Paralelamente, foi realizado o mesmo ensaio com o antifúngico nistatina nas concentrações de 1024 µg/mL a 4 µg/mL. Um controle de micro-organismo foi realizado colocando-se nas cavidades 100 µL do mesmo CSD duplamente concentrado, 100 µL de água destilada estéril e 10 µL do inóculo de cada espécie. Para verificar a ausência de interferência nos resultados pelos solventes utilizados na preparação da emulsão, no caso o DMSO (dimetilsulfóxido) e o Tween 80, foi feito um controle no qual foram colocados nas cavidades 100 µL do caldo duplamente concentrado, 50 µL de DMSO (5%), 50 µL de Tween 80 (2%) e 10µL da suspensão fúngica. Um controle de esterilidade do meio também foi realizado, onde foi colocado 200 µL do CSD em um orifício sem a suspensão dos fungos. As placas foram assepticamente fechadas e incubadas a 35°C por 24 - 48 hs para ser realizada a

leitura. A CIM para cada extrato e antifúngico foi definida como a menorconcentração capaz de inibir visualmente o crescimento fúngico verificado nos orifícios quando comparado com o crescimento controle. Os experimentos foram realizados em duplicata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais é avaliada através da menor concentração da substância teste necessária para inibir o crescimento do microrganismo exposto, esse valor é a Concentração Inibitória Mínima (CIM). Nesse estudo, foram realizados testes de microdiluição em caldo e observou-se que a CIM do extrato hexânico de *Psidium guineense* (araçá) contra as diferentes cepas de *Candida Glabrata* e *Candida Parapsilosis* foi superior a 1024 µg/mL para todas as cepas testadas. Conforme apresentado nas tabelas 1e 2;

Tabela 1 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL do extrato hexânico de *Psidium guineense* contra diferentes cepas de *Candida glabrata.*

CIM	**Cepas de** ***C. glabrata***			
	LM 06	LM 17	LM 116	LM 302
1024 µg/mL	-	-	-	-
512 µg/mL	-	-	-	-
256 µg/mL	-	-	-	-
128 µg/mL	-	-	-	-
64 µg/mL	-	-	-	-
32 µg/mL	-	-	-	-
Controle negativo	-	-	-	-
Controle positivo	+	+	+	+

Não teve inibição (-)
Teve inibição (+)

Fonte: Autor.

Tabela 2 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL do extrato hexânico de *Psidium guineense* contra diferentes cepas de *Candida parapsilosis.*

CIM	**Cepas de C. *parapsilosis***				
	ATCC 22019	LM 04	LM 09	LM 14	LM 02
1024 µg/mL	-	-	-	-	-
512 µg/mL	-	-	-	-	-
256 µg/mL	-	-	-	-	-
128 µg/mL	-	-	-	-	-
64 µg/mL	-	-	-	-	-
32 µg/mL	-	-	-	-	-
Controle negativo	-	-	-	-	-
Controle positivo	+	+	+	+	+

Não teve inibição (-)
Teve inibição (+)

Fonte: Autor.

De acordo com Sartoratto et al. (2004) para uma atividade antimicrobiana de produtos de origem natural ser considerada como forte, estes devem possuir a CIM de até 500 µg/mL, moderada para CIM de 600 a 1500 µg/mL e fraca para CIM acima de 1500 µg/mL. Com isso, diante dos resultados obtidos pela técnica de microdiluição em caldo não foi possível classificar o efeito antifúngico do extrato em estudo, visto que os valores da CIM foram maiores que 1024 µg/mL para todas as cepas analisadas.

Além disso, também é possível observar nas tabelas que houve crescimento

das cepas nos poços de controle negativo confirmando a viabilidade das cepas fúngicas utilizadas para os testes. Já nos poços da placa referentes ao controle positivo foi possível verificar a inibição do crescimento fúngico, demonstrando que as cepas testadas são sensíveis ao antifúngico controle utilizado, neste caso a nistatina.

Divergente do estudo em questão, Nascimento et al. (2017) demonstraram o potencial efetivo do óleo essencial das folhas de *P. guineense* como sendo antioxidante, antiproliferativo, anti-inflamatório e antimicrobiano contra bacérias. Estes autores sugeriram que a predominância do espatulenol, correspondendo a mais de 80% da sua composição, é parcialmente responsável pelos efeitos terapêuticos associados associados à espécie.

Apesar dos resultados desse trabalho terem se mostrados ineficazes contra as cepas do gênero *Candida*, estudos como os de Fernandes et al. (2021) associaram a presença principalmente de flavonoides e taninos no extrato aquoso de frutos e folhas de *P. guineense* como eficazes contra cepas de *Streptococcus mutans*. Além desse Macedo et al. (2021) analisaram a atividade antimicrobiana dessa espécie contra *Sthaphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*, que possuem histórico de resistência a antibióticos, e demonstraram que os extratos aquoso e de acetato de etila apresentaram um forte efeito antimicrobiano contra cepas de *S. aureus* (CIM = 250 –500 µg/mL) e *K. pneumoniae* (CIM = 64 µg/mL).

4. CONCLUSÃO

Com essa pesquisa, chegou-se a conclusão que o extrato hexânico de *Psidium guineense* não apresentou atividade antifúngica frente as cepas *de Candida glabr*ata e *Candida parapsilosis*, por meio da técnica utilizada, apresentando uma Concentração Inibitória Mínima (CIM) superior a 1024 µg/mL, sendo necessário maiores estudos para descartar o potencial antifúngico do extrato hexânico de *Psidium guineense* contra outras cepas do gênero *Candida.*

REFERÊNCIAS

BORGES, C. A. *et al.* Diagnóstico e formas de tratamento da candidíase oral: uma revisão de literatura**. Research, Society and Development**, Minas Gerais, v. 10, n. 15, p. 1-9, nov./2021.

BRANDÃO, H. N. *et al*. Fitoterapia no tratamento da candidíase oral: Um protocolo de revisão de

escopo. **Research, Society and Development**, Paraíba, v. 10, n. 7, p. 1-7, jun./2021.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evalution of new antimicrobials in vitro and in experimental animal infections. In: Lorian, V. M. D. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. New York: Willians & Wilkins, p. 739-788, 1991.

FERNANDES, T.G. *et al* In vitro synergistic effect of Psidium guineense (swartz) in combinatiomn with antimicrobial agents against methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains. **Sci. World J** 2021.

HADACEK F, GREGER H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparatibility of results and assay choice. **Phytochemical Analyses**, v.11, p. 137-147, jun. 2000

MACEDO, J. G. F. *et al.* Therapeutic indications, chemical composition and biological activity of native Brazilian species from Psidium genus (Myrtaceae): A review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 278, p. 114-248, 2021.

NASCIMENTO, K. F. D. *et al.* Antioxidant, anti-inflammatory, antiproliferative and antimycobacterial activities of the essential oil of Psidium guineense Sw. and spathulenol. **Journal of Ethnopharmacology**, São Paulo, v. 210, n. 2, p. 351-358, ago./2017.

NUNES, M. A. F. Análise da sensibilidade para diagnóstico molecular de candidíase. 2017.

PERETI, J. M.; MAZA, L. Ocorrência de candidíase oral em pacientes submetidos a tratamentos antineoplásicos. **Journal of the Health Sciences Institute**, São Paulo, v. 39, n. 3, p. 195-198, ago./2021.

ROCHA, W. R. V. D. *et al.* Gênero Candida: Fatores de virulência, Epidemiologia, Candidíase e Mecanismos de resistência. **Research, Society and Development**, São Paulo, v. 10, n. 4, p. 1-14, abr./2021. Disponível em: https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/14283/12866. Acesso em: 8 mai. 2022.

SARTORATTO A, MACHADO AL, DELARMELINA C, FIGUEIRA GM, DUARTE MC, REHDER VL. Composição e atividade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas aromáticas utilizadas no Brasil. **Braz. J. Microbiol**. Dez. 2004; 35: p. 275-280

UGUÑA, K. B. C.; LEÓN, P. P.; CHACHA, A. F. Efecto antifúngico de diferentes concentraciones del extracto de Uncaria Tomentosa sobre Candida albicans: Estudio invitro. **Revista Odontología**, v. 19, n. 2, p. 30-39, 2017.

VILA, T. *et al.* Oral candidiasis: A disease of opportunity. **Journal of Fungi**, 6, n. 1, p. 15,2020.