



ATIVIDADE ANTIFÚNGICA PRELIMINAR DOS EXTRATOS DE *PUNICA GRANATUM* (LINNAEUS) E *PSIDIUM GUAJAVA* (LINNAEUS) SOBRE *CANDIDA ALBICANS*

ANTIFUNGAL ACTIVITY OF *PUNICA GRANATUM* (LINNAEUS) AND *PSIDIUM GUAJAVA* (LINNAEUS) EXTRACTS IN *CANDIDA ALBICANS*

Ceslaine Santos Barbosa¹

¹Biomédica, Faculdade do Sul da Bahia (FASB), Teixeira de Freitas-BA

Érica Ferreira Alves²

²Biomédica, Faculdade do Sul da Bahia (FASB), Teixeira de Freitas-BA

Jorge Luiz Fortuna³

³Professor da área de Microbiologia do curso de Ciências Biológicas da Universidade do Estado da Bahia (UNEB), Campus X. Endereço para correspondência: Universidade do Estado da Bahia (UNEB), Campus X, Laboratório de Microbiologia. Av. Kaikan, s/n – Universitário. Teixeira de Freitas-BA. CEP: 45.992-294

Wagner Gonçalves Macena⁴

⁴Professor e Coordenador dos Cursos de Biomedicina e Enfermagem da Faculdade do Sul da Bahia (FASB), Campus II, Teixeira de Freitas-BA

RESUMO

O presente estudo buscou avaliar a atividade antifúngica dos extratos de goiabeira vermelha (*Psidium guajava* Linnaeus) e romanzeiro (*Punica granatum* Linnaeus) contra *Candida albicans*, em diferentes concentrações e em diferentes solventes. Os testes foram realizados a partir de extratos vegetais secos. Ação antifúngica foi avaliada pela técnica de difusão do extrato em discos branco de papel em Ágar Sabouraud Dextrose. Os extratos das plantas *P. guajava* e *P. granatum* apresentaram atividade inibitória contra *C. albicans*, a partir dos dois solventes, entretanto, o extrato do romanzeiro, utilizando álcool a 70% como solvente, demonstrou maior atividade, se comparado aos demais, promovendo inibição até a concentração de 25% (0,25), diferente dos outros, que apresentaram inibição significativa apenas nas concentrações de 100% (1,0). Diante da dificuldade de tratamento de infecções fúngicas e a resistência que seu agente etiológico adquire aos antifúngicos sintéticos o estudo incentiva a produção de medicamentos alternativos para um tratamento mais eficaz. Porém, fazem-se necessários estudos para avaliar a toxicidade e a ação antifúngica, para garantir a qualidade do fitoterápico.

Palavras-Chave: Fitoterápico; Plantas Medicinais; Antifúngicos.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the antifungal activity of the extracts of red guava tree (*Punica granatum* Linnaeus) and pomegranate tree (*Psidium guajava* Linnaeus) against *Candida albicans* at different concentrations in different solvents. Tests were made from dried plant extracts. Antifungal activity was evaluated by extract diffusion technique on blank paper disks in Sabouraud Dextrose Agar. The extracts of *P. guajava* and *P. granatum* showed inhibitory activity against *C. albicans*, from the two solvents, however, the pomegranate tree's extract, using 70% alcohol as solvent, showed higher activity compared to the others, promoting inhibition at the concentration of 25% (0.25), different from the other, which only showed significant inhibition at concentrations of 100% (1.0). Due to the difficulty of treating fungal infections and the resistance that its etiologic agent acquires to synthetic antifungal, the study encourages the production of alternative drugs for more effective treatment. Nevertheless, studies are needed to evaluate the toxicity and antifungal action to ensure the quality of herbal medicine.

Keywords: Phytotherapeutic; Medicinal Plants; Antifungal.

INTRODUÇÃO

O uso das plantas é comum no campo da medicina para a produção de fitoterápicos e no uso popular, por meio do conhecimento empírico, na utilização em forma de chás, sumos e extratos. Neste contexto, a fitoquímica mostra-se relevante para o estudo dos compostos químicos presente nas plantas capazes de alcançar efeito farmacológico, o que possibilita o desenvolvimento de novos fármacos com menos efeitos colaterais e menos resistência microbiana, por meio da biotecnologia (1).

O Brasil é o país de maior biodiversidade mundial e juntamente com a diversidade de etnias e culturas, possui vasto conhecimento na ação fitoterápica, capaz de permitir um grande desenvolvimento terapêutico com o uso desse recurso (2).

As ações dos compostos naturais atuam em sítios específicos dos microrganismos. Em geral promovem desintegração da membrana celular,

desestabilização da força próton motriz (FPM), fluxo de elétrons, transporte ativo e coagulação do conteúdo da célula, conferindo instabilidade ao microrganismo e destruindo-o (3).

Pertencente à família Punicaceae, *Punica granatum* Linnaeus (romanzeiro) (Figura 1A), é uma planta frutífera que possui propriedades medicinais, sendo usada popularmente como anti-inflamatória no tratamento de algumas doenças como disenteria, colite e diarreia (4).

A planta *Psidium guajava* Linnaeus (goiabeira vermelha) (Figura 1B) é uma espécie pertencente à família Myrtaceae conhecida popularmente, essa frutífera tropical está distribuída mundialmente e hoje é cultivada nos trópicos devido suas propriedades comprovadamente medicinais, além da valorização das suas propriedades comestíveis (5,6).



Figura 1. (A) *Punica granatum* Linnaeus (romanzeiro) e (B) *Psidium guajava* Linnaeus (goiabeira vermelha). Fonte: Arquivo Pessoal.

Candida albicans é um microrganismo comensal, que reside normalmente no hospedeiro, fazendo parte da sua microbiota normal (pele, boca, trato gastrointestinal e vagina), sem causar nenhuma doença (7).

No entanto, quando ocorre um desequilíbrio na microbiota ou no sistema imune do hospedeiro, *C. albicans* deixa de ser comensal e tende a se manifestar agressivamente, tornando-se patogênica (8). *C. albicans* possui um mecanismo bem desenvolvido e de rápida adaptação a

alterações que podem ocorrer no hospedeiro (9).

As combinações de agentes antifúngicos têm sido usadas, com frequência, para o tratamento de micoses, buscando alcançar o sinergismo. Essas estratégias agem em vários sítios do fungo, o que permite sua inibição. Dentre elas, alterações nos estágios da via bioquímica, a permeabilidade do fungo, inibição do transporte de um agente para fora da célula, e a inibição de vários alvos dos processos metabólicos do fungo simultaneamente (10).

Contudo, o uso excessivo destes fármacos propicia o surgimento de leveduras resistentes, principalmente em pacientes imunossuprimidos, susceptíveis a infecções frequentes. Assim, há necessidade do desenvolvimento de novos fármacos de maior eficácia, dentre as possibilidades, surge a utilização de fitoterápicos como tratamento alternativo. Os mesmos se diferem por apresentar uma diversidade molecular superior aos sintéticos, proporcionando novas descobertas, com pesquisa nas atividades biológicas que podem favorecer na prevenção e tratamento de doenças (11).

O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica dos extratos de *Punica granatum* Linnaeus e *Psidium guajava* Linnaeus sobre *Candida albicans*, em diferentes concentrações e extraídos a partir de dois diferentes solventes (éter etílico a 35% e álcool a 70%).

MATERIAIS E MÉTODOS

As plantas utilizadas neste estudo – goiabeira vermelha (*Psidium guajava* Linnaeus) e romanzeiro (*Punica granatum* Linnaeus) – foram coletadas em locais distintos, encontradas em residências. A primeira no bairro São Lourenço do Município de Teixeira de Freitas-BA e a segunda no bairro Cajarana do Município de Alcobaça-BA. Os espécimes foram identificados no Herbário Vies São Mateus do Centro Universitário Norte do Espírito Santo (CEUNES) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). As exsiccatas estão depositadas na coleção do Laboratório de Botânica da Universidade do Estado da Bahia (UNEB), no Campus X em Teixeira de Freitas-BA.

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Microbiologia da UNEB, onde foram produzidos e analisados os extratos da goiabeira vermelha e romanzeiro, para a avaliação das suas atividades antifúngicas sobre *Candida albicans*.

Os testes foram realizados com extratos vegetais secos (12,13). Foram retirados os pecíolos e utilizadas apenas o limbo das folhas sadias de *P. granatum* e *P. guajava* e foram separadas e lavadas em solução de hipoclorito de sódio. Em seguida as folhas foram colocadas sobre papel toalha

para a secagem e depois colocadas na estufa a 45°C para a secagem em calor seco.

Ao término do quarto dia de secagem as folhas passaram pelo processo de moagem, onde foram seccionadas em pequenas partes e maceradas utilizando-se almofariz e pistilo. Foram utilizados 10,0 g de cada planta já processada na preparação dos extratos, sendo 5,0 g para cada tipo de solvente (12).

Cada porção (5,0 g) foi adicionada em 50,0 mL de éter etílico a 35% e 50,0 mL de álcool a 70%, tanto para a goiabeira quanto para o romanzeiro (12). Após a mistura, os frascos contendo os extratos foram embalados com papel alumínio para proteção da luz e conservados em temperatura ambiente, sendo homogeneizados duas vezes ao dia e pesados diariamente por um período de dez dias ou até o peso se estabilizar. Ao término deste processo, fez-se a filtragem dos extratos e o filtrado foi colocado em banho-maria por 48 horas a 45°C para aumentar a solubilidade de substâncias e evaporação dos solventes.

Foi realizada uma diluição seriada em razão 2 e as concentrações finais foram 1,0 (100% do extrato), 0,5 (50% do extrato); 0,25 (25% do extrato) e 0,125 (12,5% do extrato). Sendo que todos os tubos possuíam volume de 0,5 mL (12). Foram adicionados cinco discos de papel em cada um dos microtubos contendo os extratos, permanecendo por 24 horas em temperatura ambiente.

Foram utilizadas cepas de *Candida albicans* (ATCC 10231) adquiridas, na forma de doação, a partir da Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária (CMRVS) do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

As amostras foram repicadas em Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) e incubadas em estufa a 37°C por 24 horas. A suspensão fúngica foi obtida pela diluição em salina a 0,85%, sendo, posteriormente, comparada à escala 0,5 de MacFarland.

Neste estudo, os testes de sensibilidade antimicrobiana dos extratos das plantas sobre *Candida albicans* (ATCC 10231), foram realizados utilizando-se três diferentes fatores: plantas (goiabeira vermelha e romanzeiro); concentrações (1,0;

0,5; 0,25 e 0,125) e solventes para extração (éter etílico a 35% e álcool a 70%).

O teste de sensibilidade foi avaliado pela técnica de difusão em meio sólido (14), em ASD, pela semeadura da suspensão fúngica com auxílio de um swab. Os discos de papel estéreis de 6,0 mm de diâmetro ficaram mergulhados no extrato das plantas em diferentes solventes (álcool e éter) e concentrações (1,0; 0,5; 0,25; 0,125) por 24 horas e depois foram colocados sobre o meio de cultura, após a inoculação da *C. albicans*. Os solventes utilizados foram testados como controle.

As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. A atividade antifúngica foi avaliada pela medição do diâmetro dos halos de inibição em milímetros. Para controle positivo, foi utilizado disco comercial de nistatina e para controle negativo, um disco de papel estéril, sem nenhuma substância. Os testes foram realizados em triplicata.

Para determinar se houve diferença dos diâmetros dos halos em relação aos extratos das plantas e solventes utilizados para a extração, realizou-se o teste de

ANOVA ("Analysis of Variance"), também conhecido como F-teste, do tipo a x b x c sem replicação, utilizando-se o programa *BioEstat*® 5.3 (15).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os extratos das plantas de goiabeira vermelha e romanzeiro apresentaram atividade inibitória contra *C. albicans*, nos dois solventes, entretanto, o extrato do romanzeiro utilizando álcool como solvente demonstrou maior atividade, se comparado aos demais, promovendo inibição até a concentração de 0,25, diferente dos demais (Tabela 1).

O controle positivo (nistatina) apresentou resultados esperados conforme os dados do fabricante (Tabela 1). Todos os solventes testados e os discos de controle negativo não apresentaram atividade de inibição contra *C. albicans*.

Tabela 1. Resultado da Média e Desvio Padrão dos diâmetros (milímetros) dos halos de inibição formados a partir dos discos embebidos com extratos de goiabeira vermelha e de romanzeiro em diferentes solventes e concentrações (letras diferentes nas linhas e colunas representam diferenças significativas).

PLANTAS	SOLVENTES	Concentração dos Extratos				Controle (+)
		1,0	0,5	0,25	0,125	
Goiabeira vermelha	Álcool (70%)	9,66±1,52 ^c	5,00±4,35 ^d	0,00±0,00	0,00±0,00	14,66±1,15 ^a
	Éter Etilico (35%)	9,00±1,00 ^c	2,33±4,04 ^e	2,66±4,61 ^e	4,66±4,04 ^d	14,33±0,57 ^a
Romanzeiro	Álcool (70%)	11,66±1,52 ^b	9,00±1,73 ^c	8,33±1,15 ^c	5,33±4,61 ^d	14,33±0,57 ^a
	Éter Etilico (35%)	8,66±1,15 ^c	5,33±4,61 ^d	0,00±0,00	0,00±0,00	15,00±0,00 ^a

Utilizando-se o F-teste (ANOVA) observou-se que em relação à ação antifúngica dos extratos das plantas sobre *C. albicans* houve diferença significativa ($p=0,0982$) entre plantas, solventes utilizados e concentrações. Pois o valor calculado ($F_{calc.}=5,5885$), para estes tratamentos, nos

níveis de significância 1,0% (0,01) e 5,0% (0,05) foi maior que os valores tabelados ($F_{tab.}=4,568$ e $F_{tab.}=2,947$), respectivamente.

Os resultados dos testes obtidos nesse estudo, para a ação inibitória da goiabeira vermelha, foram compatíveis com a

literatura (16,17,18), que apresentam atividade antifúngica. Alves et al. (16) apontam que esses resultados podem estar relacionados com compostos químicos presentes na planta, como os taninos, óleos essenciais com rico cariofileno e outros que são capazes de obter importante ação farmacológica.

Michelin et al. (19) apontam em suas pesquisas, que o extrato do romanzeiro não tem potencial inibitório frente a *C. albicans*, contradizendo os resultados do presente estudo e dos trabalhos de Frias e Kozusny-Andreani (20) e Abílio et al. (21), que apresentaram amplo espectro de inibição. Frias e Kozusny-Andreani (20) indicaram que a capacidade fungicida ou fungistática dessa planta pode estar relacionada, segundo análises fitoquímicas, à presença de taninos e flavonoides.

A estrutura histológica da planta está associada com o poder de penetração dos solventes, em regiões muito compactadas como no caule e raízes é mais difícil a penetração, e mais fácil em folhas e flores, por possuírem tecidos de textura mais delicados, justificando o uso das folhas para os testes em questão (12). Fatores sazonais também podem interferir na composição fitoquímica das plantas, a época de coleta é um dos fatores que mais influenciam na atividade farmacológica de drogas vegetais, uma vez que, a obtenção dos constituintes ativos não é constante durante o ano (22), sendo que a presente pesquisa realizou a coleta no mês de agosto.

A depender do solvente utilizado é possível extrair diferentes tipos de substâncias. Simões et al. (12) indicaram que utilizando o éter, são preferencialmente extraídos: lipídios, ceras, pigmentos e furanocumarinas; com o álcool e misturas hidroalcoólicas é possível extrair: heterosídeos em geral, saponinas e taninos. Não houve identificação das substâncias que apresentaram ação antifúngica nos extratos das plantas de goiabeira vermelha e romanzeiro, uma vez que o objetivo do trabalho foi avaliar se há ação antifúngica.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os extratos das folhas das plantas goiabeira vermelha e romanzeiro apresentaram ação antifúngica, sendo que o extrato obtido do romanzeiro, com o solvente álcool, na concentração 1 apresentou melhores resultados. O experimento incentiva o isolamento de substâncias químicas presentes nessas plantas, a fim de possibilitar a produção de medicamentos alternativos. Apesar dos extratos apresentarem resultados inibitórios, a nistatina apresentou resultados superiores, fazem-se necessários estudos para garantir a mesma ação antifúngica destes extratos, além de avaliar a toxicidade e a viabilidade dos extratos frente a um processo infeccioso para garantir a qualidade do fitoterápico.

REFERÊNCIAS

- (1) FOGLIO, M.A. et al. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. **MultiCiência**. v. 7, n. p, 2006.
- (2) BRASIL. Ministério da Saúde (MS). Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos**. Brasília: 2006.
- (3) SILVA, N.C.C. **Estudo comparativo da ação antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais e sinergismo com drogas antimicrobianas**. 2010. 69 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada). Instituto de Biociências. Botucatu-SP. Universidade Estadual Paulista (UNESP). 2010.
- (4) ANIBAL, P.C. **Estudo da composição química e ação inibitória dos extratos obtidos de**

- Punica granatum* L. (Romã) sobre *Candida* ssp.** 2010. 112 f. Tese (Doutorado em Biologia Bucodental). Faculdade de Odontologia de Piracicaba. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). 2010.
- (5) MENEZES, J.S. **Ação antimicrobiana in vitro de *Psidium guajava* L. contra *Staphylococcus aureus* isolados de leite materno.** 2013. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Faculdade de Ciência Animal. Universidade José do Rosário Vellano. 2013.
- (6) ZIETEMANN, C.; ROBERTO, S.R. Produção de mudas de goiabeira (*Psidium guajava* L.) em diferentes substratos. **Revista Brasileira de Fruticultura.** v. 29, n. 1, p. 31-36, 2007.
- (7) MARTINS NETO, M.; DANESI, C. C.; UNFER, D. T. Candidíase Bucal. Revisão da Literatura. **Revista Saúde.** v. 31, n. 1-2, p. 16-26, 2005.
- (8) BARBEDO, L.S.; SGARBI, D.B.G. Candidíase. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis.** v. 22, n. 1, p. 22-38, 2010.
- (9) GOMEZ, C.A.S. **Tratamento ortodôntico em pacientes diabéticos.** 2015. 55 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Dentária). Faculdade de Medicina Dentária. Universidade Fernando Pessoa. 2015.
- (10) MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M.A. **Microbiologia Médica.** Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.
- (11) ANDRADE, M.A. et al. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica.** v. 43, n. 2, p. 399-408, 2012.
- (12) SIMÕES, C.M.O. et al (Orgs.). **Farmacognosia.** Da Planta ao Medicamento. 6. ed. Porto Alegre: UFRGS. Florianópolis: UFSC. 2010.
- (13) BUSSMANN, R.W. et al. Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies. **Journal of Ethnopharmacology.** v. 132, p. 101-108, 2010.
- (14) BAUER, A. W. et al. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology.** v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.
- (15) AYRES, M.; et al. **BioEstat 5.3 – Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biomédicas.** Belém: Instituto Mamirauá. 2007.
- (16) 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*. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** v. 16, n. 2, p.192-196, 2006.
- (17) CARVALHO, A.A.T. et al. Atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos hidroalcoólicos de *Psidium guajava* L. sobre bactérias Gram-negativas. **Acta Farmacéutica Bonaerense.** v. 21, n. 4, p. 255-228, 2002.
- (18) FONSECA, J.F.; BOTELHO, A.C.F. Atividade antifúngica do extrato de folhas de *Psidium guajava* sobre leveduras do gênero *Candida*. **Revista da Faculdade de Odontologia.** v. 51, n. 1, p. 24-26, 2010.
- (19) MICHELIN, D. C.; et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** v. 15, n. 4, p. 316-320, 2005.

- (20) FRIAS, D.F.R.; KOZUSNY-ANDREANI, D.I. Utilização de extratos de plantas medicinais e óleo de Eucaliptus no controle in vitro de *Microsporum canis*. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**. v. 15, n. 3, p. 119-125, 2010.
- (21) ABILÍO, V.M.F. et al. Atividade antifúngica de produtos naturais indicados por raizeiros para tratamento de candidíase oral. **Revista Cubana de Estomatologia** v. 51, n. 3. 2014.
- (22) GONÇALVES, J.M. **Atividades biológicas e composição química dos óleos essenciais de *Achyrocline satureoides* (Lam) dc. e *Ageratum conyzoides* L. encontradas no semiárido baiano**. 2015. 111 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidade Estadual de Feira de Santana. 2015.

Enviado: 01/09/2015
Revisado: 07/12/2015
Aceito: 04/03/2016