

Avaliação in vitro da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos de plantas da região amazônica sobre cepa de *Candida albicans*

Tatiany Oliveira de Alencar MENEZES^a, Ana Cláudia Braga Amoras ALVES^b,

José Maria dos Santos VIEIRA^c, Sílvio Augusto Fernandes de MENEZES^d,

Bruno Pereira ALVES^e, Lúcia Carla de Vasconcelos MENDONÇA^f

^aMestre em Clínica Odontológica, Universidade Federal do Pará – UFPA, 66075-900 Belém - PA, Brasil

^bDoutora em Microbiologia, Universidade Federal do Pará – UFPA, 66075-900 Belém - PA, Brasil

^cDoutor em Farmácia, Universidade Federal do Pará – UFPA, 66075-900 Belém - PA, Brasil

^dMestre em Periodontia, Centro Universitário do Pará – CESUPA, 66035-170 Belém - PA, Brasil

^eDoutor em Prótese, Universidade Federal do Pará – UFPA, 66075-900 Belém - PA, Brasil

^fFarmacêutica bioquímica, Universidade Federal do Pará – UFPA, 66075-900 Belém - PA, Brasil

Menezes TOA, Alves ACBA, Vieira JMS, Menezes SAF, Alves BP, Mendonça LCV. In vitro evaluation of the anti-fungii activity of essential oils and plant extracts present in the amazon region about the strain of *Candida albicans*. Rev Odontol UNESP. 2009; 38(3): 184-91.

Resumo: A candidíase é uma doença fúngica oportunista causada pela proliferação de espécies de *Candida*, principalmente *Candida albicans*, sendo esta a espécie mais patogênica em humanos. Muitos antifúngicos existentes no mercado apresentam efeitos colaterais indesejáveis ou podem induzir a resistência fúngica, principalmente em indivíduos imunodeprimidos. Nessa perspectiva, o objetivo desta pesquisa foi avaliar in vitro a atividade antifúngica de óleos e extratos vegetais extraídos de plantas da região Amazônica e determinar a concentração inibitória mínima das espécies que apresentaram atividade antifúngica frente à cepa padrão de *Candida albicans* (ATCC 90028). A atividade antifúngica dos óleos essenciais *Copaifera multijuga*, *Carapa guianenses*, *Piper aduncum* e *Piper hispidinervum* foi avaliada pelo método de difusão em meio sólido em diluições de 32 a 2%, para determinação da concentração inibitória mínima. Os extratos de *Annona glabra*, *Azadirachta indica*, *Bryophyllum calycinum*, *Eleutherine plicata*, *Mammea americana*, *Psidium guajava* e *Syzygium aromaticum* foram testados nas concentrações de 500, 250, 125 e 62,5 mg.mL⁻¹ e a atividade antifúngica foi verificada pelo método de difusão em meio sólido, utilizando-se discos de papel filtro. Os óleos testados não apresentaram efeito antifúngico sobre a cepa de *Candida albicans* e, dos extratos testados, somente os de *Eleutherine plicata*, *Psidium guajava* e *Syzygium aromaticum* apresentaram atividade antifúngica, com concentração inibitória mínima, respectivamente, de 250, 125 e 62,5 mg.mL⁻¹. A partir dos resultados apresentados, verificou-se que os extratos de *Eleutherine plicata*, *Psidium guajava* e *Syzygium aromaticum* apresentam potencial efeito inibitório para crescimento de *Candida albicans*, servindo de guia para a seleção de plantas com atividades antifúngicas para futuros trabalhos de âmbito toxicológico e farmacológico.

Palavras-chave: *Candida albicans*; antifúngicos; plantas medicinais; Odontologia.

Abstract: Candidiasis is an opportunistic fungus disease caused by the proliferation of *Candida* species, mainly *Candida albicans*, what seems to be the most pathogenic one to humans. Several anti-fungii drugs available in the market present undesirable side effects or develop resistance, mainly in immune-depressed individuals. Hence, the aim of this paper was to evaluate in vitro the anti-fungii

activity of vegetal oils and extracts present in the Amazon region and to determine the minimal inhibitory concentration of such species that have presented anti-fungii activity against the pattern strain of *Candida albicans* (ATCC 90028). The anti-fungii activity of the essential oils *Copaifera multijuga*, *Carapa guianenses*, *Piper aduncum* and *Piper hispidinervum* was determined through the method of diffusion in a solid means and in dilutions of 32 to 2% in order to determine its minimal inhibitory concentration. The extracts *Annona glabra*, *Azadirachta indica*, *Bryophyllum calycinum*, *Eleutherine plicata*, *Mammea americana*, *Psidium guajava* and *Syzygium aromaticum* have been tested under the concentrations of 500, 250, 125 and 62,5 mg.mL⁻¹ and the anti-fungii activity was determined through the method of diffusion in a solid means using discs of filter paper. The tested oils did not present any anti-fungii effect on the strain of *Candida albicans* and, from the extracts tested, only *Eleutherine plicata*, *Psidium guajava* and *Syzygium aromaticum* have presented anti-fungii activity with minimal inhibitory concentrations, respectively, 250, 125 and 62,5 mg.mL⁻¹. With the results presented, the extracts of *Eleutherine plicata*, *Psidium guajava* and *Syzygium aromaticum* present a potential inhibitory effect to the growth of *Candida albicans*, acting as a guide for the selection of plants with anti-fungii activities for further papers on a toxicologic and pharmacologic.

Keywords: *Candida albicans*; anti-fungii; medicinal plants; Dentistry.

Introdução

A microbiota residente da boca é bastante diversificada, com mais de 700 espécies de microrganismos identificadas, das quais muitas ainda não foram formalmente descritas. Nessa vasta e complexa ecologia microbiana da cavidade bucal humana, encontram-se, pelo menos, vinte gêneros e, aproximadamente, noventa espécies de leveduras isoladas e classificadas; dentre estas, oito espécies do gênero *Candida* foram consideradas patogênicas: *Candida albicans*, *Candida guilliermondii*, *Candida kefyr*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida viswanathii* e *Candida glabrata*¹.

Dentre as espécies do gênero *Candida*, *Candida albicans* é a mais frequentemente isolada da cavidade bucal. Entretanto, a presença desse fungo não é necessariamente indicativa de doença, pois pode ser isolado em cerca de 40% de indivíduos saudáveis em diversas faixas etárias; em algumas situações, espécies do gênero *Candida* podem comportar-se como patógenos oportunistas, originando infecções como a candidíase².

Em relação ao tratamento da candidíase, grande quantidade de fármacos obtidos por meio da síntese orgânica têm sido utilizados no tratamento de infecções micóticas, como os antissépticos à base de tintura de iodo, violeta de genciana, ácido salicílico e benzoico, derivados sulfamídicos, corantes, quinonas e antifúngicos poliênicos (nistatina, anfotericina). Além desses, utilizam-se também antifúngicos como os azóis (cetoconazol, econazol, sulconazol, miconazol, clotrimazol e fluconazol) e anfotericina B. Porém, as infecções fúngicas são de difícil tratamento, fato relacionado à elevada resistência da *Candida* frente à ação de alguns antifúngicos convencionais³.

Devido à ocorrência de fatores indesejáveis, como o surgimento de resistência de algumas cepas aos antifúngicos convencionais – principalmente em indivíduos

imunodeprimidos – e a presença de efeitos tóxicos destes, o estudo de plantas com propriedades terapêuticas, abrangendo aquelas com atividade antimicótica, tem crescido consideravelmente. Dessa forma, tal estudo justifica-se não apenas pela possibilidade de uma determinada planta se constituir em recurso terapêutico alternativo, mas ainda devido às perspectivas de se isolarem substâncias que apresentem eficácia significativa, com menor índice de desvantagens.

Espécies vegetais brasileiras são usualmente utilizadas como antifúngicos e é notório que o Brasil, devido à sua diversidade vegetal, é um país conhecido mundialmente pela variedade de produtos com ação medicinal, largamente utilizados em suas diversas regiões⁴.

Na região Amazônica, tem-se uma das maiores biodiversidades, com um número satisfatório de óleos essenciais e extratos utilizados, popularmente, no tratamento de infecções fúngicas. Dentre as diversas espécies, algumas merecem destaque: *Copaifera multijuga* (copaíba), *Carapa guianensis* Aubl. (andiroba), *Piper aduncum* (pimenta-de-macaco) e *Piper hispidinervum* (pimenta longa), *Annona glabra* L. (araticum-do-brejo), *Azadirachta indica* A. Juss (Nim indiano), *Bryophyllum calycinum* Salisb. (folha-de-pirarucu), *Eleutherine plicata* Herb. (marupazinho), *Mammea americana* L. (abricó), *Psidium guajava* var. (goiabeira) e *Syzygium aromaticum* L. (cravo-da-índia).

Neste contexto, é válida a investigação in vitro da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos, presentes na região Amazônica, sobre a cepa padrão de *Candida albicans*. Faz-se também importante a determinação da concentração inibitória mínima dos óleos e extratos que apresentarem atividade antifúngica, que poderão ser aplicados na prevenção e no tratamento das infecções fúngicas com eficácia, custos baixos e menores efeitos colaterais.

Material e método

Local de estudo

A pesquisa experimental foi realizada no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia do Instituto de Ciências da Universidade Federal do Pará (UFPA).

Material botânico e obtenção da matéria-prima

A seleção das espécies vegetais incluídas neste estudo foi baseada em pesquisas que vêm sendo desenvolvidas no Museu Paraense Emílio Goeldi, no Laboratório de Fitopatologia da EMBRAPA Amazônia Oriental e no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Pará (UFPA). As espécies vegetais foram previamente selecionadas de acordo com a utilização e a crença da população da região Norte brasileira.

Os óleos essenciais e os extratos das espécies estudadas (Tabelas 1 e 2) foram identificados e extraídos no Laboratório de Agroindústria da EMBRAPA Amazônia Oriental e as exsiccatas foram depositadas no Herbário IAN desta Instituição.

Espécie fúngica

Foi utilizada a cepa de *Candida albicans* ATCC 90028, que é responsável por várias formas de infecções fúngicas em humanos e é recomendada como cepa padrão para testes de susceptibilidade antifúngica. Foi cedida pela disciplina de Microbiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP e mantida em meio de cultura específico para crescimento de levedura BDA (batata-dextrose-ágar – BDA–MERCK).

Determinação da atividade antifúngica e da concentração inibitória mínima dos óleos essenciais e extratos vegetais

Inóculo

Foram realizados repiques de *Candida albicans* em caldo Brain Heart Infusion- MERCK (BHI), incubado a 36 °C, durante 18 horas; em seguida, foi observada, microscopicamente, a morfologia celular em esfregaços das culturas coradas pelo método de Gram, para confirmação de cultura pura.

O inóculo foi preparado utilizando-se 100 µL de suspensão fúngica na concentração de 10⁶ células.mL⁻¹, padronizado de acordo com a turbidez 0,5 da escala de McFarland e confirmado em espectrofotômetro com densidade óptica de 530 nm⁵. A seguir, o inóculo foi disperso, com uma alça de Drigalski, por toda a dimensão da placa de Petri (15 x 90 mm), contendo 20 mL de meio de cultura específico BDA–MERCK.

Avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais

Os óleos foram testados in natura (100%) e em diluições de 32, 16, 8, 4 e 2% para determinação da concentração inibitória mínima (CIM)⁵.

A solução a 32% foi preparada com 1,6 mL de óleo + 0,04 mL de Tween 80 e água destilada esterilizada suficiente para completar 5 mL. Em seguida, essa emulsão foi homogeneizada em agitador Vortex (FANEM), por 15 minutos; as demais concentrações foram obtidas mediante diluições seriadas.

A atividade antifúngica foi avaliada pelo método de difusão em meio sólido, utilizando-se cavidades em placa⁵. Foram confeccionadas cavidades no meio de cultura previamente semeado com suspensão de *Candida albicans*, com auxílio de cânulas de vidro estéreis (6 mm de diâmetro), onde foram inoculados 50 µL de cada diluição dos óleos testados. O sistema foi incubado a 36 °C, por 48 horas, em estufa bacteriológica. Foram realizadas duas leituras do halo de inibição: a primeira, após 24 horas de incubação, e a segunda, após 48 horas. Todo o experimento foi realizado em duplicata.

Posteriormente, foi estabelecido como CIM a concentração do óleo capaz de desenvolver um halo de inibição do crescimento fúngico maior ou igual a 8 mm de diâmetro, medido por uma régua milimetrada^{6,7}.

Para o controle da viabilidade da cepa padrão de *Candida albicans* 90028, foi utilizada uma solução contendo apenas Tween 80 (negativo) e, como controle positivo, foi utilizada solução de nistatina, um antifúngico convencional, na concentração de 50 µg.mL⁻¹.

Avaliação da atividade antifúngica dos extratos

Os extratos liofilizados foram testados nas concentrações de 500, 250, 125 e 62,5 mg.mL⁻¹ dissolvidos em Dimetil-Sulfóxido (DMSO).

A avaliação da atividade antifúngica foi realizada pelo método de difusão em meio sólido, utilizando-se discos de papel filtro (Whartman - tipo 3) de 6 mm de diâmetro, impregnados com 10 µL de cada concentração dos extratos das plantas testadas⁷. Em seguida, os discos foram colocados em placas de Petri, previamente inoculadas com 100 µL de suspensão fúngica, em meio de cultura específico (BDA).

O sistema foi incubado a 36 °C, por 48 horas, em estufa bacteriológica. Foram realizadas duas leituras do halo de inibição: a primeira, após 24 horas de incubação, e a segunda, após 48 horas. Todo o experimento foi realizado em duplicata.

Foi considerado o halo de inibição igual ou acima de 8 mm de diâmetro⁶. Para o controle da viabilidade da cepa padrão de *Candida albicans* 90028, foi utilizada uma solução contendo apenas DMSO (controle negativo) e, como controle

Tabela 1. Óleos que tiveram sua atividade antifúngica avaliada e sua procedência

Óleos essenciais	Procedência
<i>Copaífera multijuga</i> (copaíba)	Plantio experimental da Embrapa Amazônia Oriental de Santarém - PA
<i>Carapa guianensis</i> (andiroba)	Plantio experimental da Embrapa Amazônia Oriental de Belém - PA
<i>Piper aduncum</i> (pimenta-de-macaco)	Plantio experimental da Embrapa Amazônia Oriental de Tomé-Açu - PA
<i>Piper hispidinervum</i> (pimenta longa)	Plantio experimental da Embrapa Amazônia Oriental de Belém - PA

Tabela 2. Extratos que tiveram sua atividade antifúngica avaliada e sua procedência

Extratos	Procedência
<i>Annona glabra</i> (araticum-do-brejo)	Plantio experimental da Embrapa Amazônia Oriental de Belém - PA
<i>Azadiractha indica</i> (Nim indiano)	Plantio experimental da Embrapa Amazônia Oriental de Belém - PA
<i>Bryophyllum calycinum</i> (folha-de-pirarucu)	Plantio experimental da Embrapa Amazônia Oriental de Belém - PA
<i>Eleutherine plicata</i> (marupazinho)	Plantio experimental da Embrapa Amazônia Oriental de Belém - PA
<i>Mammea americana</i> (abricó)	Plantio experimental da Embrapa Amazônia Oriental de Belém - PA
<i>Psidium guajava</i> (goiabeira)	Plantio experimental da Embrapa Amazônia Oriental de Belém - PA
<i>Syzygium aromaticum</i> (cravo-da-índia)	Mercado público da cidade de Belém - PA

positivo, foi utilizada solução de nistatina, um antifúngico convencional, na concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Os extratos testados que apresentaram atividade antifúngica (halo igual ou acima de 8 mm) foram submetidos à determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pela técnica de microdiluição em caldo^{5,7-9}.

Os testes foram realizados em caldo Muller Hinton contidos em placa de microtitulação de 96 poços e analisados pelo leitor de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Para esse teste, uma alíquota de 10 μL de cada extrato nas concentrações de 500, 250, 125, 62,5, 31,25 e 15,63 mg.mL^{-1} foi depositada em cada poço da placa contendo caldo Muller Hinton e suspensão de microorganismo padronizada para um volume final de 200 μL de cada poço. Foi realizado controle dos extratos, do caldo Muller Hinton, do microorganismo, do DMSO e da nistatina.

As placas foram incubadas a 36 °C por 24 horas e a leitura foi realizada no comprimento de onda de 650 nm em leitor de ELISA⁶. Foi considerada como CIM a menor concentração do extrato capaz de inibir o crescimento antifúngico¹⁰ (Tabela 3).

Resultado

Os óleos testados de *Copaífera multijuga*, *Carapa guianensis*, *Piper aduncum* e *Piper hispidinervum* não apresentaram efeito antifúngico em nenhuma das concentrações testadas frente à cepa de *Candida albicans* ATCC 9002.

Tabela 3. Critérios para aceitação da atividade antifúngica de extratos brutos de plantas

CIM* do extrato	Resultado
Abaixo de 100 mg.mL^{-1}	Boa atividade antifúngica
Entre 101 e 500 mg.mL^{-1}	Moderada atividade antifúngica
Entre 501 e 1000 mg.mL^{-1}	Fraca atividade antifúngica
Acima de 1001 mg.mL^{-1}	Inativo

*Concentração inibitória mínima.

Dos sete extratos testados, três apresentaram atividade antifúngica frente à levedura *Candida albicans* (Tabela 4).

O extrato das folhas de *Eleutherine plicata* foi capaz de inibir o crescimento da *Candida albicans* com a formação de um halo de inibição de 12 mm. Na determinação da concentração inibitória mínima (CIM), o extrato foi ativo até a concentração de 250 mg.mL^{-1} .

Na avaliação da atividade antifúngica com o extrato das folhas de *Psidium guajava*, foi observada a formação de um halo de inibição de 17 mm frente à cepa padrão de *Candida albicans*. Na determinação da concentração inibitória mínima (CIM), o extrato foi ativo até a concentração de 125 mg.mL^{-1} frente ao fungo testado.

Com o extrato do *Syzygium aromaticum*, houve a formação de halo de inibição de 18 mm frente à cepa de

Tabela 4. Atividade antifúngica dos extratos das espécies *Annona glabra*, *Azadiractha indica*, *Bryophyllum calycinum*, *Eleutherine plicata*, *Mammea americana*, *Psidium guajava* e *Syzygium aromaticum*, frente à cepa de *Candida albicans*

Espécie vegetal	Nome popular	Zona de inibição de crescimento (mm)
<i>Annona glabra</i>	Araticum-do-brejo	NI*
<i>Azadiractha indica</i>	Nim indiano	NI
<i>Bryophyllum calycinum</i>	Folha-de-pirarucu	NI
<i>Eleutherine plicata</i>	Marupazinho	12 mm
<i>Mammea americana</i>	Abricó	NI
<i>Psidium guajava</i>	Goiabeira	17 mm
<i>Syzygium aromaticum</i>	Cravo-da-índia	18 mm

NI = não ocorreu inibição do crescimento do fungo.

Candida albicans e a concentração inibitória mínima (CIM) foi de 62,5 mg.mL⁻¹ para o fungo testado.

Os demais extratos – *Annona glabra*, *Azadiractha indica*, *Bryophyllum calycinum* e *Mammea americana* – não apresentaram atividade contra *Candida albicans*, mesmo na maior concentração 500 mg.mL⁻¹, uma vez que, em concentrações mais altas, as soluções dos extratos não permitiram uma absorção total nos discos.

Discos com nistatina (antifúngico convencional) foram utilizados como controle positivo. Houve formação de um halo de inibição de 12 mm. Para avaliar a viabilidade do DMSO (dimetil-sulfóxido), foram utilizados discos contendo apenas DMSO, sendo considerado o controle negativo.

Discussão

Um recurso promissor para a descoberta de novos agentes antifúngicos com menores efeitos colaterais advém das plantas, usadas na medicina popular, para tratamento de infecções fúngicas, nas quais os óleos e extratos obtidos há muito tempo têm servido de base para diversas aplicações terapêuticas.

Vários estudos têm apontado excelentes propriedades terapêuticas dos óleos essenciais. Entretanto, nos ensaios relativos à atividade antifúngica dos óleos, in vitro, é possível verificar uma variedade de metodologias propostas, o que torna a comparação entre o presente trabalho e esses estudos problemática.

Neste estudo, observou-se que os métodos comumente utilizados para avaliar a ação de óleos e extratos vegetais são de difusão em disco, difusão utilizando cavidades feitas no ágar e diluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima – CIM. Porém, esses métodos são padronizados pela NCCL (National Committee for Clinical Laboratory Standards) e desenvolvidos para analisar agentes antimicrobianos, como os antibióticos¹¹.

Foi constatado durante a pesquisa que, nos testes para avaliar a atividade antifúngica de óleos essenciais, a metodologia proposta pelo CLSI não poderia, de fato, ser seguida à

risca, devido às propriedades químicas que estes apresentam. Dessa forma, propriedades como volatilidade, insolubilidade em água, viscosidade e complexidade resultam em difusão irregular dos componentes lipófilos dos óleos e, consequentemente, em concentrações desiguais do óleo no ágar¹¹.

Com o intuito de melhorar a qualidade dos procedimentos com óleos essenciais, tornou-se comum a utilização de solventes, detergentes ou emulsificadores, a exemplo do Tween 20, Tween 80, DMSO (dimetil-sulfóxido) e etanol, para facilitar a dispersão dos mesmos no meio de cultura^{12,13}. Baseando-se nesses achados, optou-se por uma metodologia utilizando-se cavidades feitas no ágar e difusão em meio sólido, com o auxílio de um agente emulsificador (Tween 80)^{5,14}.

É lícito ressaltar que, devido à falta de padronização e dificuldade de difusão dos óleos essenciais, estes sejam menos estudados do que os extratos vegetais, apesar de ser constatado, cientificamente, que cerca de 60% dos óleos possuem propriedades antifúngicas e 35% exibem propriedades antibacterianas¹⁵.

No presente estudo, nenhum dos óleos testados apresentou atividade antifúngica frente à cepa de *Candida albicans*; porém, fatores importantes, como a técnica utilizada, o meio de crescimento, o microorganismo, o material botânico, a colheita, a técnica de extração e as variações genéticas de uma mesma espécie vegetal podem alterar o teor de princípio ativo presente no óleo. Dessa forma, nota-se que há muitas variáveis e o fato de não ter sido verificado resultado positivo para a atividade antifúngica não invalida novos estudos de cunho farmacológico e microbiológico dessas espécies vegetais.

O óleo de copaíba possui um princípio ativo chamado beta carofileno, que tem ação germicida¹⁶ e, portanto, deveria provocar um resultado positivo (produção de halo de inibição), pois a maior ou menor atividade biológica dos óleos essenciais tem se mostrado dependente da composição de seus constituintes químicos, como: citral, pineno, cineol, cariofileno, elemento furanodieno, inoneno, eugenol,

eucaliptol, carvacrol e outros, que são responsáveis pelas propriedades antissépticas, antibacterianas, antifúngicas e antiparasitárias^{17,18}.

Entretanto, a ausência de atividade antifúngica do óleo de copaíba está de acordo com os resultados encontrados por Santos et al.⁷, que avaliaram a eficácia do óleo de copaíba frente a diversas bactérias e à *Candida albicans*. Os resultados mostraram uma excelente atividade do óleo contra as bactérias, porém não exibiram atividade contra o fungo.

Ao analisar a eficácia antibacteriana e antifúngica de vários óleos essenciais, inclusive os de andiroba e copaíba⁶, os autores não observaram atividade frente às cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) e *Candida albicans* (ATCC 10231).

Com relação à atividade antifúngica dos óleos de Piper aduncum e Piper hispidinervum, não houve formação de halo de inibição frente à cepa de *Candida albicans*. Também não foi encontrada, na literatura consultada, qualquer referência quanto à atividade antifúngica dessas espécies frente aos microrganismos presentes na cavidade oral, apesar de vários estudos demonstrarem seu excelente potencial como fungicidas¹⁹⁻²².

Em relação à avaliação dos extratos, não existe um consenso acerca do nível aceitável, quando comparados com os antimicrobianos padrões¹⁵. O critério adotado neste estudo foi sugerido por Holetz et al.¹⁰, baseado nos resultados de CIM.

O extrato das folhas de *Annona glabra* (araticum-do-brejo) não apresentou atividade antifúngica frente à cepa testada e, embora essa espécie tenha recebido a atenção de pesquisadores por ser utilizada na medicina popular como inseticida e antimicrobiano²³, não foram encontradas na literatura consultada pesquisas avaliando o efeito da *Annona glabra* contra microrganismos de um modo geral e, em especial, contra *Candida albicans*.

O extrato de *Azadiractha indica*, apesar de apresentar um princípio ativo chamado de azadiractin – substância muito utilizada em cosméticos, cremes, loções e creme dental, por apresentar propriedades antivirais e antibacterianas²⁴ – e ser relatado por vários autores como um bom fungicida²⁵⁻²⁸, no presente estudo, não apresentou efeito antifúngico contra *Candida albicans*.

O efeito antimicrobiano do extrato de *Azadiractha indica* sobre vários microrganismos, inclusive sobre a cepa padrão de *Candida albicans* (90028), foi avaliado²⁹ e não apresentou atividade. Outros trabalhos que também utilizaram cepa padrão não verificaram eficácia desse extrato na inibição do crescimento, in vitro, de *Candida albicans*³⁰.

Na verificação da atividade antifúngica do extrato de *Bryophyllum calycinum* (folha-de-pirarucu), não foi observada a formação de halo de inibição sobre a cepa de *Candida albicans*. Entretanto, várias propriedades medici-

nais da planta *Bryophyllum calycinum*, como ser analgésica, antibacteriana, antifúngica e antisséptica^{18,31,32}, justificam a continuação de estudos microbiológicos com outras cepas, na tentativa de obter resultados que possam contribuir para a busca de novos fitoterápicos antimicrobianos.

Na avaliação antifúngica do extrato das folhas de *Eleutherine plicata* (marupazinho), foi observada a formação de um halo de inibição de 12 mm, com uma concentração inibitória mínima de 250 mg.mL⁻¹, sendo assim considerado um extrato com moderada atividade antifúngica.

Esses achados corroboram com outros autores³³⁻³⁶ que ressaltaram a ampla utilização dessa planta na medicina popular em quase todo o país, principalmente na região Amazônica, sem comprovação científica de sua eficácia.

O extrato das folhas da *Mammea americana* (abricó) não apresentou eficácia antifúngica sobre a cepa de *Candida albicans*. Entretanto, foi encontrada excelente propriedade vermífuga do abricó³⁷, além de outras propriedades, como para o tratamento de afecções cutâneas. Justifica-se, dessa forma, a continuação do estudo dessa planta com outros microrganismos.

Na avaliação antifúngica do extrato de *Psidium guajava* (goiabeira), foi constatada uma boa atividade antifúngica frente à cepa de *Candida albicans*, pois exibiu um halo de inibição de 17 mm e uma concentração inibitória mínima de 125 mg.mL⁻¹. Esse resultado está de acordo com outros trabalhos^{38,40} que avaliaram a atividade do extrato de *Psidium guajava* sobre cepas padrões de *Candida albicans* e discorda de trabalhos em que o extrato não apresentou atividade antifúngica⁴¹.

Não obstante serem diferentes cepas, concentrações, metodologia e origem das plantas utilizadas nos trabalhos citados, os resultados são aceitáveis, devido à falta de padronização dos testes de suscetibilidade antifúngica.

O extrato de *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia), que apresentou um halo de inibição de 18 mm frente à cepa de *Candida albicans* e uma concentração inibitória mínima (CIM) de 62,5 mg.mL⁻¹, é considerado um extrato com boa atividade antifúngica, segundo os critérios adotados nesta pesquisa.

A inibição do crescimento apresentou-se homogênea, de acordo com o grau de concentração do extrato da planta, havendo uma diminuição proporcional dos halos à medida que a concentração do extrato foi diminuindo.

Vários trabalhos^{11,42,43} avaliaram a eficácia antifúngica do *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia) frente à cepa de *Candida albicans* e encontraram resultados similares, reforçando a boa atividade antifúngica desse extrato.

Sabe-se que o principal princípio ativo do *Syzygium aromaticum* é o eugenol, que é um composto fenólico muito utilizado na Odontologia como componente de seladores e outros produtos antissépticos de higiene bucal^{44,45}. Entretanto, pesquisadores preocupados com a toxicidade do

eugenol na cavidade oral realizaram um estudo, in vitro, para investigar os efeitos na formação do biofilme⁴³. Concluíram que o eugenol apresenta potente atividade, in vitro, contra *Candida albicans* e com baixa citotoxicidade.

Há necessidade de busca de novos produtos com efeito antifúngico devido ao crescente aparecimento de cepas resistentes aos antifúngicos convencionais e, principalmente, devido aos indesejáveis efeitos colaterais. Os resultados apresentados neste trabalho indicam um potencial efeito antifúngico dos extratos de *Eleutherine plicata* (marupazinho), *Psidium guajava* (goiabeira) e *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia).

Dessa forma, os dados obtidos nesta pesquisa se mostram promissores e podem servir como guia na seleção de plantas com atividades antifúngicas de futuros trabalhos para determinados efeitos toxicológicos e farmacológicos, na perspectiva de uma possível aplicação terapêutica desses produtos.

Conclusão

Com base nos resultados encontrados, conclui-se que:

- Os óleos essenciais de *Copaifera multijuga*, *Carapa guianensis*, *Piper aduncum* e *Piper hispidinervum* não apresentaram atividade antifúngica sobre a levedura de *Candida albicans*;
- O extrato de *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia) apresentou uma boa atividade antifúngica frente à cepa padrão de *Candida albicans*;
- Os extratos de *Psidium guajava* (goiabeira) e de *Eleutherine plicata* (marupazinho) apresentaram moderada atividade antifúngica; e
- Os demais extratos testados (*Annona glabra*, *Azadiractha indica*, *Bryophyllum calycinum* e *Mammea americana*) não apresentaram atividade antifúngica frente à cepa padrão de *Candida albicans*.

Referências

1. McIntyre G. Oral candidosis. Dental Update. 2001; 28:132-9.
2. Campisi G, Pizzo G, Milici ME. Candidal carriage in the oral cavity of human immunodeficiency virus- infected subjects. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2002;93:281-6.
3. Araújo JCLV, Lima EO, Caballos BSO, Freire KRL, Souza EL. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microorganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. Rev Patol Trop. 2004;33:55-64.
4. Botelho MA, Nogueira NA, Bastos GM, Fonseca SG, Lemos TL, Matos EJ. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia siloides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. Braz J Med Biol Res. 2007;40:349-56.
5. Lima IO, Oliveira RAG, Lima EO, Farias NMP, Souza EL. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *candida*. Rev Bras Farmacogn. 2006;16:197-201.
6. Packer JF, Luz MMS. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. Rev Bras Farmacogn. 2007;17:102-7.
7. Santos AO, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Veiga Júnior VF, Pinto AC, Nakamura CV. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008;103: 277-81.
8. National Committee for Laboratory Standards. Método de Referência para testes de Diluição em caldo para determinação da Sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica: norma aprovada. NCCLS. 2001;22(15):36-7.
9. Bertini LM. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. Infarma. 2005;17(4):80-3.
10. Holecz FB. Screening of some plants used in the brazilian folk medicine for the treatment of infections diseases. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002;97:1027-31.
11. Nascimento PFC, Nascimento AC, Rodrigues CS, Antonioli AR. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. Braz J Pharmacogn. 2007;17:108-13.
12. Bruni R, Medici A, Andreotti E, Fantin C, Muzzolli M, Dehesa M, et al. Chemical composition and biological activities of ishpingo essential oil, a traditional ecuadorian spice from *ocotea quixos* (lam) *kosterm* (lauraceae) flower calices. Food Chem. 2004;85:415-21.
13. Baydar H, Saodiço O, Ozkan G, Karadoan T. Antibacterial activity and composition of essential oils from *origanum*, *thymbra* and *satureja* espécies with commercial importance in turkey. Food Control. 2004;15:169-72.
14. Nunes XP, Maia GL, Almeida JRG, Pereira FO, Lima EO. Antimicrobial activity of the essential oil of *Sida cordifolia* L. Braz J Pharmacogn. 2006;16:642-4.
15. Oliveira RAG, Lima EO, Vieira WL, Freire KRL, Trajano VN, Lima IO. Estudo da transferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. Rev Bras Farmacogn. 2006;16:77-82.
16. Wang HK. The therapeutic potential of flavonoids. Drugs. 2000;9:2103-19.
17. Craveiro AA, Fernandes AG, Andrade CHS, Matos FJA, Alencar JW. Óleos essenciais de plantas do nordeste. Fortaleza: Editora UFC; 1981.
18. Souza EL, Lima EO, Freire KRL, Sousa CP. Inhibitory action of some essential oils and phytochemicals on the growth of moulds isolated from foods. Braz Arch Biol Technol. 2005;48:245-50.
19. Lunz AMP, Oliveira MN, Pereira JBM, Sousa MMM. Informações gerais sobre a pimenta longa. EMBRAPA-CPAF/AC; 1996.

20. Bastos CN, Benchimol RL. Avaliação do óleo essencial de *Piper aduncum* sobre o crescimento micelial de patógenos de plantas ornamentais. In: Anais do III Congresso Brasileiro de Defensivos Agrícolas Naturais; 2006. Belém: EMBRAPA; 2006. p. 158.
21. Estrela JLV, Fazolin M, Catani V, Alécio MR, Lima MR. Toxicidade de óleos essenciais de *Piper aduncum* e *Piper hispidinervum* em *Sitophilus zeamais*. Pesq Agropec Bras. 2006;41:217-22.
22. Souza ACAC, Poltronieri LS, Costa RC, Pereira DRS, Fecury MM, Santos IP, et al. Ação do extrato do cravo da Índia sobre o crescimento micelial de fungos fitopatogênicos. In: Anais do III Congresso Brasileiro de Defensivos Agrícolas Naturais; 2006. Belém: EMBRAPA Amazônia Oriental; 2006. p. 11.
23. Carvalho JEU, Nascimento WMO, Muller CH. Tolerância de sementes de araticum-do-brejo (*annona glabra* L.) ao dessecamento e ao congelamento. Rev Bras Fruticultura. 2001;23: 179-82.
24. Biswas K, Ishita C, Ranajit K, Uday B. Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). Current Science. 2002;82:1336-44.
25. Sairam M. Antimicrobial of a new vaginal contraceptive NIM-76 from NET oil (*Azadirachta indica*). J Ethnopharmacol. 2000;71:377-82.
26. Araújo LVC, Rodriguez ICE, Paes JB. Características físico-químicas e energéticas da madeira de Nim indiano. Scientia Forestalis. 2000;57:153-9.
27. Subapriya R, Nagini S. Medicinal properties of neem leaves: a review. Bentham Science Publishers. 2005;8:149-58.
28. Fecury MM, Poltronieri LS, Costa RC, Souza ACAC. Efeito in vitro do óleo essencial de neem no crescimento micelial de fitopatógenos. In: Anais do III Congresso Brasileiro de Defensivos Agrícolas Naturais; 2006. Belém: EMBRAPA Amazônia Oriental; 2006. p. 15.
29. Gualtieri M, Villata C, Guillén AM, Lapenna E. Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos de la *Azadirachta Indica* A. Juss (Neem). INHRR. 2004;35(1):1-7.
30. Crocco EI, Mimica LMJ, Muramate LH, Garcia CS. Identificação de espécies de *Candida* e susceptibilidade antifúngica in vitro: estudo de 100 pacientes com candidíases superficiais. An Bras Dermatol. 2004;79:689-97.
31. Nassis CZ, Haebisch EMAB, Giesbrecht AM. Antihistamine activity of bryophillum calycinum. Braz J Med Biol Res. 1992;25:929-36.
32. Da Silva AS. The anti-leishmanial effect of kalanchoe is mediated by mediated by nitric oxide intermediates. Parasitology. 1999;118:575-82.
33. Albuquerque JM. Plantas medicinais de uso popular. Brasília: ABES/MEC; 1989.
34. Vieira LS. Fitoterapia da Amazônia: manual de plantas medicinais (a Farmácia de Deus). 2ª ed. São Paulo: Agronômica Ceres; 1992.
35. Mors WB, Rizzini CT, Pereira NA. Medicinal plants of Brazil. Michigan: Reference Publications; 2000.
36. Gonçalves AL. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. Arq Inst Biol. 2005;72:353-8.
37. Mourão KSM, Beltrati CM. Morphology and anatomy of developing fruits and seeds of *Mammea americana* L. Rev Bras Biol. 2000;60:701-11.
38. Pessini GL, Holetz FB, Sanches NR, Cortez DAG. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. Rev Bras Farmacogn. 2003; 13:21-4.
39. Alves PM, Leite PHAS, Pereira JV, Higino JS, Lima EO. Atividade antifúngica do extrato de *Psidium guajava* linn (goiabeira) sobre leveduras do gênero *Candida* da cavidade oral: uma avaliação in vitro. Rev Bras Farmacognon. 2006;16:192-6.
40. Nair R, Kalariya T, Chanda S. Antibacterial activity of some plant extracts used in folk medicine. J Herb Pharmacother. 2007;7:191-201.
41. Martinez MJ, Molina N, Boucourt E. Evaluación de la actividad antimicrobiana del *psidium guajava* L. Rev Cubana Plant Med. 1997;2(1):12-4.
42. Taguchi Y, Ishibashi H, Takizawa T, Inoue S. Protection of oral or intestinal candidiasis in mice by oral or intragastric administration of herbal food, clove (*Syzygium aromaticum*). Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi. 2005;46(1):27-33.
43. He M, Du M, Fan M, Bian Z. In vitro activity of eugenol against *candida albicans* biofilms. Mycopathologia. 2007;163:137-43.
44. Delespaul Q, Billerbeck VG, Roques CG, Michel G. The antifungal activity of essential oils as determined by different screening methods. Journal of Essential Oil Research. 2000;12:256-66.
45. Raina VK, Srivastava SK, Aggarwal KK, Syamasundar KV. Essential oil composition of *Syzygium aromaticum* leaf from little andaman Índia. Flavour Fragrance Journal. 2001;16:334-6.

Autor para correspondência:

Tatiany Oliveira de Alencar Menezes
tamenezes2008@hotmail.com

Recebido: 13/11/2008

Aceito: 16/06/2009