

AVALIAÇÃO DA AÇÃO DE EXTRATOS VEGETAIS SOBRE A FORMAÇÃO DE BIOFILMES POR *Candida albicans*

EVALUATION OF THE PLANT EXTRACTS ACTION ON BIOFILM FORMATION BY *Candida albicans*

Noara Taline Pereira dos Reis¹

Taline Chaves Lelis²

Alexandre Tourino Mendonça³

Jorge Kleber Chavasco⁴ (PQ)

¹ Acadêmica bolsista do Probioc UNIFAL-MG

² Acadêmica da UNIFAL-MG

³ Professor da UNINCOR - Universidade Vale do Rio Verde-Três Corações -MG

⁴ Departamento de Microbiologia e Imunologia - Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG - Alfenas, MG

Autor Correspondente

Prof. Dr. Jorge Kleber Chavasco

Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG)

Rua Gabriel Monteiro da Silva 700

37130-000-Alfenas-MG-Brasil

Email: jkchavasco@uol.com.br

RESUMO: O biofilme é constituído por uma comunidade diversificada de microrganismos aderida sobre superfícies bióticas e abióticas, formado inclusive por *Candida albicans*. Na cavidade bucal, a presença de biofilme constitui o primeiro passo para o desenvolvimento de cárie dentária e doença periodontal, o que torna necessário a avaliação da eficácia de novas alternativas, como o uso de extratos vegetais, para promover a prevenção. Foram avaliadas as atividades inibitórias de extrato de folha de jabuticabeira (*Myrciaria cauliflora*) e extrato de folha de goiabeira (*Psidium guajava* L) na formação de biofilme por *Candida albicans*, pois esta levedura é largamente encontrada associada as doenças da boca. Foram utilizadas microplacas para cultivo da levedura e para avaliar o grau de inibição da formação do biofilme através da aderência verificada pela turvação no leitor de ELISA. Nenhum dos extratos inibiu a formação do biofilme nas concentrações utilizadas.

Palavras chave: Biofilme. Inibição. Extrato de jabuticabeira (*Myrciaria cauliflora*). Extrato de goiabeira (*Psidium guajava* L). *Candida albicans*.

ABSTRACT: The biofilm consists of a diverse community of microorganisms attached on biotic and abiotic surfaces, formed by *Candida albicans*. In the oral cavity, the presence of biofilm is the first step towards the development of dental caries and periodontal disease, which makes it necessary to assess the effectiveness of new alternatives, such as the use of plant extracts, to promote prevention. We evaluated the inhibitory activities of the extract of the jabuticabeira leaf (*Myrciaria cauliflora*) and leaf extract of guava (*Psidium guajava* L) in biofilm formation by *Candida albicans*, as this yeast is generally associated with diseases of the mouth. Microplates were used for yeast cultivation and to assess the degree of biofilm formation inhibition through the turbidity checked by turbidity in the ELISA reader. None of the extracts inhibited biofilm formation at the concentrations used.

Keywords: Biofilm. Inhibition. Extract of jabuticabeira (*Myrciaria cauliflora*). Extract of guava (*Psidium guajava* L). *Candida albicans*.

1 INTRODUÇÃO

Candida albicans é um microrganismo comensal, isolado com frequência da cavidade bucal de indivíduos saudáveis. As diferentes formas de candidose bucal, superficial ou sistêmica, são frequentemente associadas a biofilmes formados por *Candida albicans*. (RAMAGE et al., 2005). Essas leveduras têm sido isoladas de biofilmes dentários (NIKAWA et al., 2003), demonstrando que os mesmos podem estar correlacionados no desenvolvimento de cáries e na patogênese de doenças periodontais. (JARVENSIVU et al., 2004).

A candidíase ou candidose é uma infecção fúngica produzida pela levedura *Candida albicans* a qual vive nas mucosas e só causa doenças quando existem condições que favoreçam o seu crescimento. É a mais comum das infecções fúngicas que afetam a boca; podem desenvolver-se em qualquer superfície da mucosa e normalmente, em pacientes infectados pelo HIV, apresentam a lesão no palato duro e palato mole (AIDS, 2003).

Biofilmes são formados por comunidades heterogêneas de microrganismos, que se acumulam em superfícies, organizadas tridimensionalmente, e embebidas, em uma matriz extracelular de polímeros (MARSH, 2004). Os biofilmes apresentam características de desenvolvimento e traços fenotípicos únicos, quando comparados com as mesmas células

crescidas em culturas planctônicas, os que os tornam mais resistentes a agentes antimicrobianos e fatores imunes do hospedeiro (DAVEY E O'TOOLE, 2000).

Diversos produtos de origem vegetal mostram ser potencialmente interessantes, no que se refere a sua atividade antimicrobiana (YANAGIDA A, 2000). Dentre estas se destacam a goiabeira e a jabuticabeira.

A planta *Psidium guajava* L., 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 e dor de barriga (VENDRUSCULO 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, b-bisaboleno, aromadendreno, p-selinemo, a-pinemo e 1,8-cineol; triterpenóides (ácido oleanólico, ursólico, catecólico, guaiavólico, maslínico), b-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) verificaram que a espécie *Psidium guajava* foi uma das mais

ativas frente às leveduras *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*.

A espécie *Myrciaria cauliflora* conhecida, popularmente, como jabuticaba paulista, jabuticaba assú (ASCHERI et al., 2006) ou jabuticaba ponhem (BRUNINI et al., 2004), é uma planta nativa do Brasil, da Mata Atlântica, que vegeta diversos solos, podendo ser encontrada desde o Pará ao Rio Grande do Sul. Os estudos fitoquímicos da jabuticaba encontrados na literatura são poucos, estando reportada a presença de ácido ascórbico, taninos e glicosídeos cianidínicos e peonidínicos (REYNERTSON, 2006). MACEDO-COSTA (2008) observou resultados positivos do extrato do caule de *Myrciaria cauliflora* Berg. sobre cepas de *Lactobacillus casei* e *Streptococcus mitis*.

O estudo de compostos e extratos de produtos naturais tem sido realizado visando a obtenção de agentes antimicrobianos que possibilitem a prevenção de doenças bucais, especialmente as relacionadas ao biofilme dental, com o máximo de efetividade e o mínimo de agressão ao organismo (BOTELHO et al., 2007). A busca por agentes antimicrobianos com aplicabilidade terapêutica e economicamente viáveis torna-se um evento importante na promoção da saúde bucal da população.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram avaliadas as atividades inibitórias dos extratos hidroetanólicos da

folha de jabuticabeira (*Myrciaria cauliflora*) e de folha de goiabeira (*Psidium guajava* L) na formação de biofilme por *Candida albicans*. Foram utilizados 11 isolados de *Candida albicans* oriundos de pacientes com candidose eritematosa, mantidos na micoteca do Laboratório de Micologia do ICB da USP, em São Paulo. As amostras foram mantidas em Agar Sabouraud dextrose. Para a realização dos testes utilizou-se o seguinte protocolo: para obtenção dos extratos hidroetanólicos foram pesados 200 g de folhas e adicionados 800 mL de etanol a 70 %. A maceração foi realizada por 5 dias com uma agitação diária. Após 5 dias os extratos foram filtrados, concentrados em rotaevaporador e liofilizados. Os extratos liofilizados das folhas de jabuticabeira e goiabeira, foram utilizados em concentrações decrescentes em meio de cultura Caldo Sabouraud Dextrose 2 vezes concentrado em microplacas de 96 cavidades próprias para cultivo celular e incubadas a 37°C por 96 horas juntamente com a amostra da levedura. As diluições de *P. guajava* L foram realizadas a partir da concentração de 62,0 mg/mL ou seja 31,0; 16,5; 8,25; 4,12; 2,06 e 1,03 mg/mL. As diluições de *M. cauliflora* foram realizadas a partir da concentração de 42,6 mg/mL ou seja 21,3; 10,6; 5,3; 2,66; 1,33 e 0,66 mg/mL. Após o tempo de incubação da microplaca a 37°C por 96 horas em estufa sob agitação, o meio de cultura foi removido e os poços foram lavados com água destilada para remoção de células não aderidas. Solução de cristal violeta a 0,5

% foi adicionada aos poços por 20 minutos. As placas foram lavadas com água destilada e adicionou-se 200 microlitros de álcool a 96°GL em cada poço. A formação de biofilme foi avaliada em um leitor de ELISA e considerada positiva quando a densidade óptica a 570 nm fosse maior ou igual a 0,2 (WAKIMOTO, 2004). Paralelamente foram feitos os seguintes controles: esterilidade do extrato, esterilidade do meio de cultura, promoção do crescimento e inibição pela solução de clorexidina a 0,12%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Vários agentes antimicrobianos vêm sendo estudados, com o objetivo de inibir ou reduzir a formação do biofilme dental, crescimento bacteriano, e conseqüentemente a adesão de microrganismos à superfície dentária (KORNMAN, 1986; MORAN et al., 2001; RODRIGUES JÚNIOR et al., 1998).

No presente artigo, buscou-se verificar a ação dos extratos hidroetanólicos de *Psidium guajava* L e *Myrciaria cauliflora* no controle da formação de biofilme por *Candida albicans*.

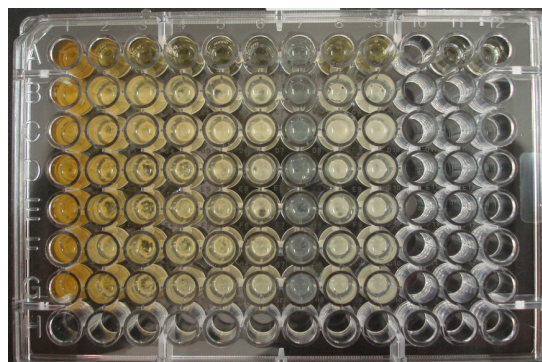
Para comprovação e avaliação do crescimento de biofilme foram feitos testes com 11 amostras de *Candida albicans*. Verificou-se através do leitor de ELISA que em todas essas 11 amostras houve crescimento e formação de biofilme, considerado positivos valores acima de 0,2 de absorbância. As amostras de leveduras 12 IAF

e 16- FBC obtiveram os maiores valores de crescimento, médias 0,962 e 2,830, respectivamente.

Segundo WAKIMOTO, 2004, a inibição do biofilme poderia ser testada utilizando microplacas para cultivo celular juntamente com extratos. Com esta técnica testamos a inibição da formação do biofilme de *Candida albicans* com extratos vegetais da folha de goiabeira (*Psidium Guajava* L) e da folha de jabuticabeira (*Myrciaria Cauliflora*). De acordo com as leituras comparadas com o controle de clorexidina a 0,12% que inibiu a formação de biofilme, verificou-se que esses extratos não inibiram a formação de biofilme por nenhum dos isolados testados. A clorexidina tem sido muito utilizada no controle de formação do biofilme dental, alterando a composição bacteriana do biofilme supragengival produzindo uma redução significativa sobre o número de microrganismos por períodos prolongados. Segundo BEIGHTON; DECKER; HOMER (1991) este fato ocorre devido à sua liberação lenta na cavidade bucal (maior substantividade ou adesividade) e conseqüentemente a sua ação inibidora sobre as enzimas glicosídicas e proteolíticas. SATO et al. (2000), PESSINI et al. (2003) e ALVES M. P. et al. (2006), pesquisaram a atividade antifúngica de extratos de plantas para assepsia e esterilização encontrando atividade antimicótica de *Psidium guajava* frente a algumas amostras e verificaram que a espécie *Psidium guajava* foi uma das mais

ativas frente às leveduras *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. MACEDO-COSTA (2008) observou resultados positivos do extrato do caule de *Myrciaria cauliflora* Berg. sobre cepas de *Lactobacillus casei* e *Streptococcus mitis*. MACEDO-COSTA, M.R. et al. (2009) concluiu que o extrato de *Myrciaria cauliflora* produziu uma significativa atividade bacteriostática in vitro sobre linhagens de *S. mitis*, *S. mutans*, *S. sanguinis*, *S. oralis*, *S. salivarius* e *L. casei*, bactérias do biofilme dental. Nestes trabalhos verificou-se atividade inibitória dos extratos *Psidium Guajava* L e *Myrciaria Cauliflora* frente a diversos microrganismos, inclusive *C. albicans*, mas no nosso trabalho não constatamos ação inibitória no crescimento e na formação de biofilmes por *Candida albicans*. A justificativa, provavelmente, pode ser pelo fato das plantas serem de outras regiões, ou utilizado concentrações diferentes dos extratos nos testes, o que interfere nos nossos resultados. De acordo com as leituras comparadas com o controle de clorexidina a 0,12% no leitor de ELISA, verificou-se que os extratos de jaboticabeira e goiabeira não inibiram a formação de biofilme por *Candida albicans*. (FIGURA 01).

FIGURA 01- Avaliação da ação inibitória dos extratos hidroetanólicos das folhas de *Myrciaria cauliflora* e *Psidium Guajava* L. sobre o crescimento da formação de biofilme por *Candida albicans*.



Legenda: Fileira A - Colunas 1 a 6- Controle dos extratos nas concentrações de diluições 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 e 1:64. Colunas 8 e 9- Controle de esterilidade dos extratos (CEE). Colunas 11 e 12- Controle de esterilidade do meio (CEM). Fileiras B a G- Colunas 1 a 6- Controle de inibição da formação do biofilme pelos extratos. Colunas 8 e 9- Controle de crescimento das leveduras. Coluna 7 inteira- Controle de clorexidina 0.12%.

Fonte: Noara Taline Pereira dos Reis (2011).

4 CONCLUSÃO

Os extratos hidroetanólicos das folhas de *Psidium guajava* L e *Myrciaria cauliflora*, utilizados neste experimento, não apresentaram ação inibitória no crescimento e na formação de biofilmes por *Candida albicans*.

5 REFERÊNCIAS

AIDS – Manifestações Oraís. **Infecções fúngicas**. Disponível em: <http://www.odontogeral.hpg.ig.com.br/aids/manifestbuciais.html>. Acesso em: 19 maio 2003.

ALONSO T. *Tratado de Fitomedicina: bases clínicas y farmacológicas*. Buenos Aires: ISIS Ediciones SRL, 1998.

ALVES M. P.; LEITE H.A.S. P.; PEREIRA V. J.; PEREIRA F. L.; PEREIRA S. V. M.; HIGINO S. J.; LIMA O. E.. 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** 16(2): p. 192-196, Abr./Jun., 2006.

ASCHERI, D.P.M.; ASCHERI, J.L.M.; CARVALHO, C.W.P. Caracterização da farinha de bagaço de jabuticaba e propriedades funcionais dos extrusados. *Ciência e Tecnologia Alimentar* Campinas, v.26, n.4, p.1-9, 2006.

BEIGHTON D, DECKER J, HOMER KA. Effects of chlorhexidine on proteolytic and glicosidic enzyme activities of dental plaque bacteria. **J Clin Periodontol** 18: 85-89, 1991.

BOTELHO, M.A. et al. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against other pathogens. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.40, p.349-56, 2007.

BRUNINI, M.A. et al. Influencia de embalagens e temperatura no armazenamento de jabuticabas (*Myrciaria jabuticaba* Berg) cv "sabará". **Ciência e Tecnologia Alimentar** Campinas, v.24, n.3, p.378-83, 2004.

DAVEY, M.E.; O'TOOLE, G. A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** v. 64, p.847-867, 2000.

JARVENSIVU, A. ; HIETAMEN, J. ; RAUTEMMA, R. ; SORSA, T. ; RICHARDSON, M. *Candida* yeast in chronic periodontitis tissues and subgingival microbial biofilms in vivo. **Periodon. Oral Microbiol.** v.10, p106-112, 2004.

KORNMAN KS. The role of supragingival plaque in the prevention and treatment of periodontal diseases: a review of current concepts. **J Periodont Res** (Suppl.): 5-22, 1986.

MACEDO-COSTA, M.R. Atividade antimicrobiana e antiaderente de *Mimosa tenuiflora* (Willd) Poir e *Myrciaria cauliflora* Berg sobre bactérias do biofilme dental. p. 72, 2008. Monografia (Graduação em Odontologia) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

MACEDO-COSTA, M.R.; DINIZ N. D. ; CARVALHO M. C. ; PEREIRA V. M.S. ; PEREIRA V. J. ; HIGINO S. J.. Eficácia do extrato de *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg. (jabuticabeira) sobre bactérias orais. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 19(2B): p. 565-571, Abr./Jun., 2009.

MARSH, P.D. Dental plaque as a microbial biofilm. **Caries Res.** v.38, p 204-211, 2004.

MORAN J, ADDY M., NEWCOMBE RG, MARLON I. A Study to assess the plaque inhibitory action of newly formulated triclosan toothpaste. **J Clin Periodontol** 28: 86-89, 2001.

NIKAWA, H.; YAMASHIRO, H.; MAKIHIRA, S.; NISHIMURA, M.; EGUSA, H.; FURUKAWA, M.; et al. In vitro cariogenic potential of *Candida albicans*. **Mycoses.** v.46, p.47 1-478, 2003.

PESSINI GL, Holetz FB, Sanches NR, Cortez DAG, Dias-Filho BP, Nakamura CV. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. **Rev Bras Farmacogn**, 13(Supl. 1): 21-24, 2003.

RAMAGE, G.; SAVILLE, S. P.; THOMAS, D.P.; LOPEZ-RIBOT, J.L *Candida* biofilms: an update. **Eukaryot. Cell.** v.4, p.633-638, 2005.

REYNERTSON, K.A. et al. Bioactive depsides and anthocyanins from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*). **Journal of Natural Products**, v.69, p.1228-30, 2006.

RODRIGUES JÚNIOR AL. Redução do índice de placa com listerine. Avaliação do índice de placa em relação ao uso de listerine e/ou escovação. **RGO** 46: 101-108, 1998.

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.

TÔRRES 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.

VENDRUSCULO 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.

YANAGIDA A. Inhibitory effects of apple polyphenols and related compounds on cariogenic factors of *mutans streptococci*. **Journal Agricola Food Chemical** 48:5666-5671, 2000.

WAKIMOTO, N.; NISHI, J.; SHEIKH, J.; NATARO, J.M.; SARANTUYA, J.; IWASHITA, M.; MANAGO, K.; TOKUDA, K.; YOSHINAGA, M. AND KAWANO, Y. Quantitative biofilm assay using microtiter plate to screen for enteroaggregative *Escherichia coli*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 71, p.687-690,2004.