

CENTRO UNIVERSITÁRIO DO PARÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO PROFISSIONAL EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA

Raimundo de Souza Vasconcelos Neto

Desenvolvimento de Enxaguante bucal contendo extrato de folhas de *Psidium guajava* (*Myrtacea*) e avaliação da ação antifúngica sobre *Candida albicans*

Belém

2020

CENTRO UNIVERSITÁRIO DO PARÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO PROFISSIONAL EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA

Raimundo de Souza Vasconcelos Neto

Desenvolvimento de Enxaguante bucal contendo extrato de folhas de *Psidium guajava* (Myrtaceae) e avaliação da ação antifúngica sobre *Candida albicans*

Monografia apresentada para o exame de qualificação do Programa de Pós-graduação em Odontologia, Mestrado Profissional em Clínica Odontológica.
Orientadora: Dra. Mileide Paz de Brito.

Área de Concentração: Periodontia

Belém

2020

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
Biblioteca do CESUPA, Belém – PA

Vasconcelos Neto, Raimundo de Souza.

Desenvolvimento de enxaguante bucal contendo extrato de folhas de *Psidium guajava* (*Myrtaceae*) e avaliação da ação antifúngica sobre *Candida albicans* / Raimundo de Souza Vasconcelos Neto; orientadora Mileide Paz de Brito. – 2020.

Dissertação (Mestrado em Clínica Odontológica) – Centro Universitário do Estado do Pará, Belém, 2020.

1. Enxaguante bucal. 2. Medicamento fitoterápicos. 3. Farmacologia dentária. I. Brito, Mileide Paz de, orient. II. Título.

CDD 23ª ed. 615.0246176

CENTRO UNIVERSITÁRIO DO PARÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO PROFISSIONAL EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA

Desenvolvimento de Enxaguante bucal contendo extrato de folhas de *Psidium guajava* (Myrtaceae) e avaliação da ação antifúngica sobre *Candida albicans*

Data: 14/12/2020

Conceito:

Banca examinadora:

Prof. Dra. Mileide Paz de Brito (Orientadora)
Centro Universitário do Pará

Prof. Dr. Fabricio Anderson Carvalho Almeida
Centro Universitário Fibra

Dr. Aluísio Ferreira Celestino Júnior
Centro Universitário do Pará

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	6
2 MATERIAIS E MÉTODOS	7
2.1- OBTENÇÃO E PREPARO DO EXTRATO DE FOLHAS DE GOIABA (<i>PSIDIUM GUAJAVA</i>)	7
2.1.1 - Obtenção da matéria prima	7
2.1.2 - Preparo da matéria prima	7
2.1.3 - Obtenção do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Psidium guajava</i>	7
2.1.4 - Determinação do teor de flavonóides totais: curva padrão de quercetina com cloreto de alumínio.....	7
2.1.5 - Quantificação de flavonóides	8
2.2 - PREPARO DO ENXAGUATÓRIO BUCAL DE FOLHAS DE GOIABEIRA (<i>Psidium guajava</i>).....	8
2.2.1 - Avaliação das características organolépticas dos produtos	9
2.2.2 - Avaliação das características físico-químicas	9
2.3 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO EXTRATO E DO ENXAGUATÓRIO BUCAL DAS FOLHAS DE GOIABA (<i>Psidium guajava</i>)	9
2.3.1 - Teste de Sensibilidade por Difusão em Ágar	9
2.3.2 - Determinação da concentração inibitória mínima (CIM), pelo método de diluição em ágar.	9
3 RESULTADOS	10
4 DISCUSSÃO	13
5 CONCLUSÃO.....	15
REFERÊNCIAS.....	16

RESUMO

As espécies de *Candida spp* colonizam a pele, trato gastrointestinal e geniturinário e vivem em nossa microbiota como comensais, auxiliando em diversas funções na defesa inata. Por outro lado, esses microrganismos podem causar infecções cutaneomucosas e sistêmicas em humanos. O Brasil possui uma grande variedade de plantas e dentre elas podemos encontrar a goiaba vermelha ou *Psidium guajava*. Estudos revelaram que o extrato da folha da *P. guajava* apresenta atividade antifúngica sobre as leveduras de *Candida spp*. e concluiu que a utilização de seu extrato é de fácil acesso e baixo custo a população, porém ainda vem sendo negligenciados quando o assunto é saúde bucal. O objetivo do presente estudo foi obter um enxaguante bucal contendo extrato de folhas de *P. guajava* sobre *Candida spp*. Como resultado, observou-se atividade antimicrobiana descrita na literatura para o extrato, bem como para as formulações propostas, contudo, alguns aspectos ainda necessitam ser aperfeiçoados na formulação, com o sabor do produto e o pH.

Palavras-Chaves: Medicamentos Fitoterápicos; Candida; Psidium; Plantas Medicinais.

ABSTRACT

Candida spp colonize the skin, gastrointestinal and genitourinary tract and live in our microbiota as commensals, assisting in various functions in the innate defense. On the other hand, these microorganisms can cause cutaneomucosal and systemic infections in humans. Brazil has a wide variety of plants and among them we can find red guava or *Psidium guajava*. Studies have revealed that *P. guajava* leaf extract has antifungal activity on *Candida* spp and concluded that the use of its extract is easy to access and low cost to the population, however it is still being neglected when it comes to oral health. The aim of the present study was to obtain a mouthwash containing extract of leaves of *P. guajava* on *Candida* spp. As a result, it was observed the antimicrobial activity described in the literature for the extract, as well as for the proposed formulations, however, some aspects still need to be improved in the formulation, with the product's flavor and pH.

Key words: Phytotherapeutic Drugs; *Candida*; *Psidium*; Medicinal Plants.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma grande variedade de plantas e dentre elas podemos encontrar a goiaba vermelha ou *Psidium guajava*¹, que é uma planta nativa de áreas tropicais da América Central e América Latina, pertencente à família *Myrtaceae*².

O fruto da goiabeira é um alimento muito popular e amplamente aceito no mercado, pois tem alto valor nutricional e pode ser consumido *in natura* ou industrializado, na forma de geleias, compotas, bebidas, sorvetes, entre outros³. Além do uso para fins alimentícios, a Organização Mundial da Saúde (OMS) relaciona partes da árvore de *P. guajava*, principalmente suas folhas, como possuidoras de efeito benéfico para tratamento de algumas doenças^{1,4}.

A ação farmacológica das folhas que mais se destaca é a antimicrobiana. Estudos revelam que sua atividade antimicrobiana *in vitro* é eficaz frente bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos⁵. Nesse sentido, a inibição maior é observada em bactérias Gram positivas, quando comparada aos resultados obtidos em bactérias Gram negativas⁶.

Vale ressaltar a presença de atividade antifúngica observada a partir do macerado hidroalcoólico de suas folhas, frente a diferentes espécies de *Candida*, entre elas: a *C. albicans*, a *C. krusei*, a *C. parapsilosis* e a *C. tellatoidea*; além de fungos filamentosos como *Aspergillus fumigatus*, *Arthriniium sacchari* e *Chaetomium funicola*¹.

O potencial antimicrobiano do extrato das folhas da *P. guajava* sugere a possibilidade deste material ser utilizados em diferentes produtos para atender diferentes atividades, visto que os microrganismos citados podem causar infecções microbianas em diferentes partes do corpo, desde infecções agudas até infecções sistêmicas¹. Um estudo relatou que produtos à base fitoterápicos vêm sendo usados em cuidados com a saúde, porém ainda vem sendo negligenciados quando o assunto é saúde bucal⁷.

Portanto, este estudo propõe padronizar e avaliar um extrato a base da folha de *Psidium guajava*, elaborando um enxaguante que possua uma ação antifúngica, frente ao fungo do tipo *Candida spp.*

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1- OBTENÇÃO E PREPARO DO EXTRATO DE FOLHAS DE GOIABA (*PSIDIUM GUAJAVA*)

2.1.1 - Obtenção da matéria prima

As folhas de goiabeira (*Psidium guajava*) foram adquiridas de um fornecedor de plantas medicinais e identificadas no herbário da Embrapa Amazônia Oriental, localizada na Av. Perimetral s/n, Belém/PA.

2.1.2 - Preparo da matéria prima

As folhas coletadas foram inicialmente lavadas para a retirada de sujidades em água destilada. Em seguida, levadas para secagem e estabilização em estufa a 33°C/48 h. Após estabilização, a droga vegetal foi triturada em moinho de facas⁸.

2.1.3 - Obtenção do extrato hidroalcoólico das folhas de *Psidium guajava*

A extração hidroalcoólica foi realizada de acordo com a metodologia adaptada de Fonseca e Botelho (2010), em solução hidroalcoólica 70% (V/V) na proporção (50g em 200 mL; 1:4), em seguida, foi submetida a maceração por período de 72h a temperatura ambiente em recipiente âmbar⁸. O extrato foi congelado e liofilizado.

2.1.4 - Determinação do teor de flavonóides totais: curva padrão de quercetina com cloreto de alumínio

A quercetina foi diluída em metanol nas concentrações de 2,5 à 8,5 µg/mL, em balão volumétrico de 10 mL, onde adicionou-se 1 mL de solução de cloreto de alumínio à 2,5% (m/V). A solução compensação foi preparada da mesma maneira, mas sem adição de amostra.

As soluções permaneceram em repouso por 30 min, em seguida, realizou-se a leitura em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 425 nm.

2.1.5 - Quantificação de flavonóides

Para a quantificação de flavonóides na amostra, foram utilizados 2 mL de solução extrativa a 2 mg/mL (obtida pela dissolução de 100 mg de resíduo seco em 50 mL de etanol). Em balão volumétrico de 25 mL adicionou-se 2 mL desta amostra, 1 mL de solução de cloreto de alumínio à 2,5% (m/V) e completou-se o volume com metanol.

A solução compensação foi preparada da mesma maneira, mas sem adição de amostra. As soluções permaneceram em repouso por 30 min, em seguida, realizou-se a leitura em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 425 nm. Os valores de absorbâncias obtidos corresponderam à média de três determinações.

2.2 - PREPARO DO ENXAGUATÓRIO BUCAL DE FOLHAS DE GOIABEIRA (*Psidium guajava*)

As formulações propostas estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição das formulações de enxaguatório bucal

COMPONENTES DAS FORMULAÇÕES	Concentração (%; m/m)		
	F1	F2	Base
Extrato	4	8	-
Sacarina	0,75	1,00	1,00
Lauril Sulfato de Sódio	1,00	1,00	1,00
Sorbitol 70%	15%	15%	15%
Hidróxido de Sódio 20%	q.s.p	q.s.p	q.s.p
Água Purificada Q.S.P (MI)	100	100	100

2.2.1 - Avaliação das características organolépticas dos produtos

O enxaguatório foi analisado quanto as características organolépticas: aspecto (transparente e opaco; liso e com grumo), cor (cor aparente), odor (característico ou não característico) e sabor (doce e amargo)⁹.

2.2.2 - Avaliação das características físico-químicas

O produto foi avaliado quanto as características físico-químicas relacionadas ao pH e densidade e índice de espumas⁹.

2.3 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO EXTRATO E DO ENXAGUATÓRIO BUCAL DAS FOLHAS DE GOIABA (*Psidium guajava*)

2.3.1 - Teste de Sensibilidade por Difusão em Ágar

Nos ensaios de atividade antifúngica¹⁰, foi utilizado uma cepa de *Candida albicans* (ATCC 10231) do banco de padrões do Laboratório de Controle de Qualidade Microbiológico de Medicamentos do Centro Universitário do Pará-CESUPA, fornecido pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade - INCQS/FIOCRUZ/RJ.

O eugenol foi usado como controle positivo para as leveduras nas concentrações de 100 µg/mL. A solução diluente utilizada no preparo do extrato utilizada como controle negativo.

2.3.2 - Determinação da concentração inibitória mínima (CIM), pelo método de diluição em ágar.

Os ensaios foram realizados em triplicata, em placas de Elisa na proporção 1:2, em 10 concentrações diferentes, para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Após o período de incubação, as culturas foram reveladas com caldo bacteriológico à 1% (m/V) com solução de cloreto de trifeniltetrazólico. A manutenção da cor vermelha no meio foi interpretada como presença de crescimento microbiano (microrganismo resistente à fração avaliada).

3 RESULTADOS

O extrato hidroalcoólico foi obtido na concentração de 12 mg/mL, incorporado na formulação nas formulações com concentração de 4 e 8 % (m/V).

Tabela 1 - Curva Padrão de Quercetina

Concentração µg/mL	Absorvância (nn)
2,5	0,190
4,0	0,332
5,5	0,461
7,0	0,621
8,5	0,782

Tabela 2 - Teor de Flavonóides Totais Equivalentes a Quercetina

Extrato	Absorvância (nm)	Flavonóides Totais (µg/mL)
T4%	0,463	2,9
	0,472	2,9
	0,468	2,9
T8%	0,301	1,8
	0,306	1,8
	0,299	1,8

As fórmulas F1 e F2 apresentaram aspecto límpido e cor levemente marrom, ausência de grumos e gosto levemente amargo.

A F1 e F2 apresentaram pH de 5,11 e 5,31 respectivamente. Ambos os produtos apresentaram pequena variação de pH em relação a base (B) de extrato, como pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 3 - Determinação do pH dos produtos F1 e F2. F1: fórmula com 4% (mV) de extrato; F2: fórmula com 8% (mV) de extrato; B: Base enxaguatória

Produto	Média	DP	CV%
F1	5,11	0,08	1,56
F2	5,58	0,14	1,97
B	5,31	0,05	1,50

A F1 e F2 apresentaram densidade de 1,054 e 1,068 respectivamente. Ambos os produtos apresentaram pequena variação de densidade em relação a base (B) de extrato, como pode ser observado na Tabela 3. Este resultado revela que o extrato não alterou a densidade.

Tabela 4 - Determinação da densidade dos produtos F1, F2 e B. F1: fórmula com 4% (mV) de extrato; F2: fórmula com 8% (mV) de extrato; B: Base enxaguatória.

Produto	Média	DP	CV%
F1	1,054	0,04	0,87
F2	1,068	0,06	1,43
B	1,032	0,12	1,02

O índice de espuma da F1 e F2 foi de 9,4 mL e 9,6 mL, respectivamente. Observou-se pequena diferença entre F1, F2 e a fórmula base B na Tabela 4.

Tabela 5 - Determinação do índice de espumas (mL) dos produtos F1, F2 e B. F1: fórmula com 4% (mV) de extrato; F2: fórmula com 8% (mV) de extrato; B: Base enxaguatória.

Produto	Média	DP	CV%
F1	9,46	0,06	0,63
F2	9,85	0,04	0,40
B	9,34	0,10	1.07

Na análise de difusão em Agar a cepa de *C. albicans* (ATCC 10231) foi sensível frente ao extrato (E) e aos produtos F1 e F2, como se observa na Tabela 5.

O extrato (E) apresentou halo de inibição (22,37 mm) maior que os halos dos produtos F1(18,33 mm) e F2 (18,66 mm) frente *C. albicans* (ATCC 10231). No que se refere aos halos dos produtos a diferença foi pequena.

Tabela 6 - Halos (mm) de inibição dos produtos F1, F2 e extrato (E) frente a cepa de *C. albicans* (ATCC 10231). (n=3).

Placas	F1	F2	E	EU (controle positivo)	base (controle negativo)
1	20,50	18,95	21,40	29,40	-
2	16,40	19,00	25,55	31,50	-
3	18,10	18,85	20,80	26,00	-
Média ± DP	18,33 ± 2,05	18,93 ± 0,70	22,37 ± 2,81	28,96 ± 2,77	-

A concentração inibitória mínima nos produtos é >500 µg/mL em F1 e F2, enquanto que o extrato puro apresentou concentração inibitória de 150 µg/mL.

4 DISCUSSÃO

No extrato obtido foi observado a presença de flavonoides responsáveis pela ação antimicrobiana da planta, dados descritos e confirmados na literatura previamente¹¹. O gosto levemente amargo deve-se à presença do extrato. Apesar do uso de adoçantes nas formulações, este aspecto ainda deve ser melhorado.

A saliva tem pH em torno de 6,0 e 7,0¹² e o pH em ambos os produtos ficaram abaixo de 6, por isso, sugere-se o ajuste do pH das formulações para 6, com substância acidificante que possa proporcionar pH mais compatível da mucosa oral. Em relação aos parâmetros de densidade e índice de espumas, observa-se que as concentrações de extrato utilizados em ambas as formulações apresentaram pequenas alterações, segundo a análise estatística descritiva.

Os resultados obtidos da atividade antifúngica do extrato estão de acordo com outro estudo realizado⁸. Tanto o extrato como as F1 e F2 são sensíveis, por outro lado, observou-se uma atividade antifúngica menor nas F1 e F2, quando comparada com o extrato puro. Este resultado é justificado pelo fato do extrato está diluído em solução.

Vários microrganismos vivem em nossa microbiota como comensais, auxiliando em diversas funções na defesa inata. Entre esses microrganismos, as espécies de *Candida spp* colonizam na microbiota da pele, trato gastrointestinal e geniturinário¹².

A *Candida spp.* é uma levedura que age de maneira conjunta com diversos fatores contra as defesas do hospedeiro. No caso da infecção pelo agente, vários fatores auxiliam o fungo a gerar patologias entre eles a aderência à célula epitelial, a capacidade de crescimento como blastosporos, pseudo-hifas e hifas, a produção de enzimas hidrolíticas (proteases, fosfolipases e lisofosfolipases), a produção de endotoxinas de baixa e alta massa molecular, e a composição da parede celular que facilita a adesão e a penetração através do tecido infectado¹³.

A *Candida albicans* é a espécie mais prevalente do gênero e em virtude de ser um patógeno oportunista, vem sendo muito estudada pela sua variedade de fatores de virulência, sua onipresença e pelo aumento do número de pacientes com fatores de risco para infecção por essa levedura. Com a epidemia da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), ocorreu um aumento significativo na prevalência de candidíase¹⁴.

Vários extratos vegetais têm revelado excelente ação antifúngica, porém os resultados são em sua maioria referente às respostas observadas frente a microrganismos padrão, o que não permite visualizar-se como seria a respostas frente a microrganismos com resistências diferentes¹⁵.

Um estudo prévio revelou que o extrato da folha da *Psidium guajava* apresenta atividade antifúngica sobre as leveduras de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. stelatoidea* e *C. krusei* e concluiu que a utilização de seu extrato é de fácil acesso e baixo custo a população¹.

Outros autores consideram o desenvolvimento de novos antissépticos bucais tendo o extrato de *P. guajava* como componente adicional, visto que obtiveram bons resultados com o microorganismo *in vitro* e que o uso de antimicrobianos nem sempre é efetivo⁸. Produtos à base fitoterápicos vêm sendo usados em cuidados com a saúde, porém ainda vem sendo negligenciados quando o assunto é saúde bucal⁷.

5 CONCLUSÃO

Pode-se concluir, que neste estudo observou-se o potencial do extrato de *Psidium guajava* sobre a *C. albicans* na produção de formulações, como uma nova alternativa terapêutica e profilática mais natural para promover uma melhora na saúde bucal.

REFERÊNCIAS

- 1 - Alves P.M., Queiroz L. M. G., Pereira J. V. Atividade antimicrobiana, antiaderente e antifúngica in vitro de plantas medicinais brasileiras sobre microrganismos do biofilme dental e cepas do gênero *Candida*. *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical*. 2002; 42 (2):222-224.
- 2 - Morton, J.F. *Fruits of Warm Climates*; Creative Resource Systems, Inc.: Winterville, 1987.
- 3 - Natale W., Prado R.M. Fertirrigação em goiba. *Fertirrigação: teoria e pratica*. 2009; (1), 494-535.
- 4 - Gutiérrez, R.M.P.; Mitchell, S.; Solis, R.V. *Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *J. Ethnopharmacol*. 2008, (117): 1–27.
- 5 - Nair, R. Chanda, S. In Vitro antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. leaf extracts against clinically important pathogenic microbial strains. *Braz. J. Microbiol*. 2007, (38): 452–458.
- 6 - Dhiman, A.; Nanda, A.; Narasimhan, B. In vitro antimicrobial activity of methanolic leaf extract of *Psidium guajava* L. *J. Pharm. Bioallied Sci*. 2011; 3, 226–229.
- 7 - Zanin, S. M. W.1; Miguel, M. D; Barreira, S. M. W. Nakashima, T. 1; Cury, C. D; Costa, C. K. Enxaguatório bucal: principais ativos e desenvolvimento de FÓRMULA contendo extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* L. *Visão Acadêmica*. 2007; 8(1).
- 8 - Fonseca J. F; Botelho A. C. F. Atividade antifúngica do extrato de folhas de *psidium guajava* sobre leveduras do gênero *candida*. *Rev. Fac. Odontol*. 2010, 51(1), 24-26.
- 9 - Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2011.

10 - USA. NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard. Pennsylvania: 2003.

11 - Lorenzi H, Matos FJA. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum. 2002, 542.

12 - Barbedo L.S; Sgarbi D. BG. Candidíase DST - J bras Doenças Sex Transm. 2010, 22(1): 22-38.

13 - Geraldino T. H; Costa T. M.P. S; Brunnel C. R; Cunha N; V; Micheletti P; Costa I. C; Felipe I. Dimorfismo, produção de enzimas funcionais e adesinas de *Candida albicans*: Mini Revisão. Biosaúde. 2012, 14(1).

14 - Peixoto L. R; Rosalen P.L; Ferreira G. L. S; Freires I. A; Carvalho F. G; Castelhana L. R; Castro R. D. Antifungal activity, mode of action and anti-biofilm effects of *Laurus nobilis* Linnaeus essential oil against *Candida* spp. 2016, 73:179-185.

15 - Okamoto M. K. H. Estudo das atividades cicatrizante e antimicrobiana do extrato glicólico e do gel de *Psidium guajava* L. e estudo da estabilidade do gel. 2010.