

Atividade antifúngica de *Schinus terebinthifolius* (Aroeira) sobre cepas do gênero *Candida*

Antifungal activity of *Schinus terebinthifolius* (Aroeira) on *Candida* strains

Irlan A. FREIRES¹, Livia A. ALVES¹, Vanessa C. JOVITO², Ricardo D. CASTRO³

1-Graduando (a) em Odontologia pela Universidade Federal da Paraíba.

2-Cirurgiã-dentista pela Universidade Federal da Paraíba

3- Professor Doutor Adjunto do Departamento de Clínica e Odontologia Social da Universidade Federal da Paraíba.

RESUMO

Objetivo: avaliar a atividade antifúngica de *Schinus terebinthifolius* (aroeira) frente à *Candida albicans* (ATCC289065), *C. tropicalis* (ATCC40147) e *C. krusei* (ATCC40042). Material e Método: o ensaio de atividade antifúngica foi realizado pela técnica de difusão em meio sólido. Em meio de cultura Agar Sabouraud Dextrose (HIMEDIA®, São Paulo, Brasil) foram semeadas as linhagens fúngicas utilizando-se swabs. Em seguida, foram inseridos sobre a superfície do meio, discos absorventes estéreis previamente imersos em 50µL da tintura de Aroeira (10%). Como controle positivo, foram utilizados discos imersos em 50µL de Nistatina (1:100.000UI). As placas foram conduzidas à estufa, à 37° C, por 48 horas. O estudo foi feito em triplicata e analisado estatisticamente através do teste Mann Whitney. Resultados: a aroeira foi responsável pela formação de halos de inibição de

crescimento das três cepas em estudo e não houve diferença estatisticamente significativa entre o produto e o controle. Sobre *C. albicans* encontraram-se os maiores halos de inibição de 16 mm para aroeira e 18 mm para o controle ($p=0,1642$). Frente à *C. tropicalis*, os maiores halos foram de 16 mm para aroeira e 18 mm para o controle ($p=0,8248$). Sobre *C. krusei*, verificaram-se halos de 14 mm para o produto e controle ($p=0,6193$). Conclusão: aroeira apresentou atividade antifúngica equivalente ao controle frente às cepas de *Candida* avaliadas. Destarte, sugere-se a realização de outros estudos microbiológicos, toxicológicos e clínicos para verificar a viabilidade de uso na odontologia.

PALAVRAS-CHAVE: Anacardiaceae, *candida albicans*, *candida tropicalis*, produtos naturais.

INTRODUÇÃO

Candida albicans e, em menor proporção, outras espécies de *Candida*, são comumente encontradas na cavidade bucal não apenas de adultos, mas também de crianças. Estão presentes nos dentes, língua, bochechas e mucosa palatina e também em materiais restauradores e próteses dentárias¹.

Espécies de *Candida* podem viver como microrganismos comensais em indivíduos saudáveis, mas são capazes de causar infecção, se houver condições predisponentes relacionadas ao hospedeiro. A capacidade infecciosa desta levedura depende também da produção de fatores de virulência, tais como tubos germinativos, proteases e fosfolipases^{2,3}.

Na cavidade oral, espécies de *Candida* residem, tipicamente, em biofilmes mistos, com interações fúngico-bacterianas ditando as propriedades gerais e sobrevivências das espécies. A formação do biofilme é, pois, um mecanismo de sobrevivência para garantir a permanência dos microrganismos na cavidade bucal^{1,3}.

Embora *C. albicans* seja ainda a principal causa da candidose, outras espécies – tais como *C. glabrata*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. tropicalis* – estão se tornando cada vez mais prevalentes. Tal fato pode estar relacionado ao uso (profilático) de antimicóticos¹.

No cenário atual, a resistência de fungos patogênicos a múl-

tiplas drogas e o pequeno número de classes de antifúngicos disponíveis direcionam as pesquisas para a descoberta de novos agentes antifúngicos a partir de outras fontes^{4,5}.

O arsenal terapêutico de antifúngicos, de uso sistêmico e tópico, ainda é restrito, e é clara a necessidade de novos agentes mais eficazes e menos tóxicos⁵, pois muitas dessas drogas antifúngicas sintéticas disponíveis pertencem ao mesmo grupo de ação farmacológica e possuem o mesmo mecanismo de ação; contudo, os fungos respondem de forma significativamente diferente quanto à susceptibilidade a elas⁶.

Nesse sentido, as plantas medicinais têm sido o recurso tradicional mais importante do homem para tratar infecções microbianas, e constituem uma importante fonte na busca de novos fármacos com atividades terapêuticas, em especial pela crescente resistência dos microrganismos aos fármacos atuais, e a aparição de novas espécies patogênicas, de origem viral ou fúngica, sendo esta última principalmente em pacientes imunocomprometidos⁷.

Dentre inúmeras espécies de plantas com propriedades medicinais^{8,9}, especialmente atividade antimicrobiana, a literatura cita *Schinus terebinthifolius* – popularmente conhecida como Aroeira¹⁰⁻¹⁷.

A aroeira pertence à família *Anacardiaceae* e possui outros nomes comuns como: aroeira-vermelha, aroeira-mansa, aroeira-

branca, aroeira-da-praia, aroeira-do-sertão, aroeira-do-paraná, araguaraiá, corneiba, fruto-de-sabiá e árvore-da-pimenta¹⁸.

Schinus terebinthifolius é uma espécie nativa da América Central e do Sul e pode também ser encontrada em regiões semi-tropicais e tropicais dos Estados Unidos e África¹⁹. Possui ação antimicrobiana, antiinflamatória e antiulcerogênica, sendo utilizada como antisséptico e no tratamento de estomatites. As folhas da planta são comumente utilizadas em diferentes países no tratamento de doenças venéreas, inflamação do útero, infecções do aparelho urinário, feridas de pele, diarreias e úlcera gastroduodenal²⁰.

Nessa perspectiva, esse estudo se propôs a avaliar, *in vitro*, a atividade antifúngica da tintura da casca de *Schinus terebinthifolius* (Aroeira) na inibição do crescimento de *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, espécies envolvidas na etiologia da candidose oral.

MATERIAL E MÉTODO

Produto avaliado

A tintura da casca de *S. terebinthifolius* (100 mg.mL⁻¹) foi adquirida em farmácia de manipulação, sendo um produto comercializado na cidade João Pessoa, Paraíba, Brasil. A tintura atende à todas as especificações exigidas concernentes ao seu controle de qualidade conforme análises realizadas pelo fornecedor.

Microrganismos utilizados

Foram utilizadas cepas de *C. albicans* (ATCC 289065), *C. tropicalis* (ATCC 40147) e *C. krusei* (ATCC 40042) obtidas no Laboratório de Microrganismos de Referência da Fundação Oswaldo Cruz. Suspensões das cepas testes foram preparadas em solução salina estéril e padronizadas de acordo com a escala Nefelométrica de McFarland, correspondendo à concentração de aproximadamente 10⁶ Unidades Formadoras de Colônia por mL - (UFC.mL⁻¹).

Determinação da Atividade Antifúngica *in vitro*

O ensaio de atividade antifúngica foi realizado através da técnica de difusão em meio sólido. Adicionou-se 20 mL do meio de cultura *Agar Sabouraud Dextrose* (HIMEDIA®, São Paulo, Brasil) - (ASD) em cada placa de Petri descartável. Sobre o ASD foram semeadas as linhagens fúngicas (inóculos preparados em solução salina), utilizando-se swabs alginatados.

Em seguida, foram inseridos sobre superfície do ASD discos absorventes estéreis previamente imersos em 50µL da tintura da casca de Aroeira (100 mg.mL⁻¹). Como controle positivo foram utilizados discos imersos em 50µL de Nistatina (Suspensão Oral, 100.000 UI.mL⁻¹).

As placas foram então conduzidas à estufa bacteriológica, à 37° C, por 48 horas. A leitura para determinação da atividade antifúngica foi feita através da mensuração dos halos de inibição do crescimento fúngico, por meio de paquímetro manual.

O estudo foi feito em triplicata e analisado estatisticamente através do teste não-paramétrico Mann Whitney, utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 5.0.

O presente estudo trata-se de uma pesquisa *in vitro*, sem utilização de material biológico de origem humana. Portanto, assim

como determina a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, não existe necessidade de aprovação prévia do projeto no comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos.

RESULTADOS

Verificou-se que todas as linhagens fúngicas avaliadas mostraram-se susceptíveis à ação da tintura da casca da Aroeira.

A tabela 1 apresenta as médias dos diâmetros das zonas de inibição do crescimento fúngico (em mm) promovidas pela Aroeira e pelo controle, não havendo diferença estatisticamente significativa entre ambos frente às três espécies de *Candida* (Nível de significância de 5%).

Tabela 1. Diâmetros das zonas de inibição de crescimento de *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (em mm) promovidos pela tintura de *Schinus terebinthifolius* (Aroeira) e Nistatina. Estudo realizado em triplicata.

Microrganismos	Tintura de Aroeira (100 mg.mL ⁻¹)	Nistatina (100.000UI.mL ⁻¹) – Controle Positivo	Valor de p (Mann Whitney test)
<i>Candida albicans</i>	25,32	33,32	0,1642
<i>Candida tropicalis</i>	25,32	29,32	0,8210
<i>Candida krusei</i>	26,66	25,32	0,6193

Observaram-se valores mais expressivos do produto frente à *Candida krusei*, com diâmetro da zona de inibição de 26,66 mm, ao passo que o controle apresentou halo de 25,32 mm frente ao mesmo microrganismo (Tabela 1).

As figuras 1, 2 e 3 mostram placas representativas com os halos de inibição do crescimento de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, respectivamente.

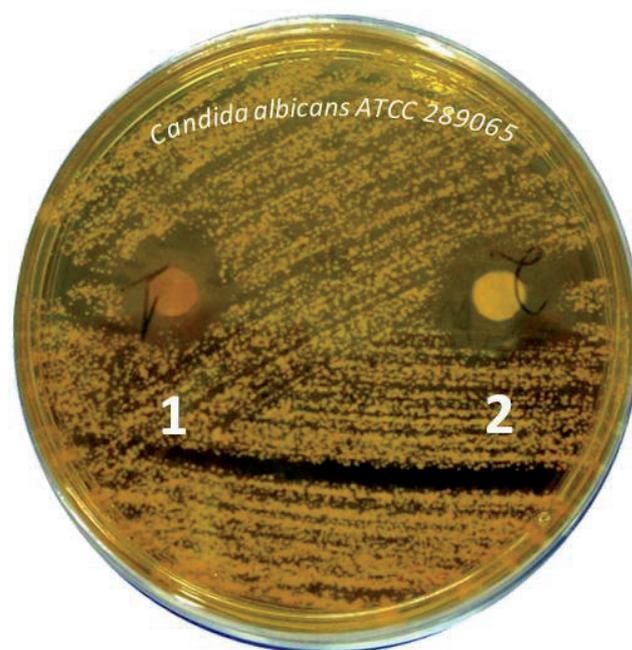


Figura 1. Halos de Inibição do crescimento de *C. albicans* promovidos pela tintura de Aroeira (1) e Controle Positivo (2).

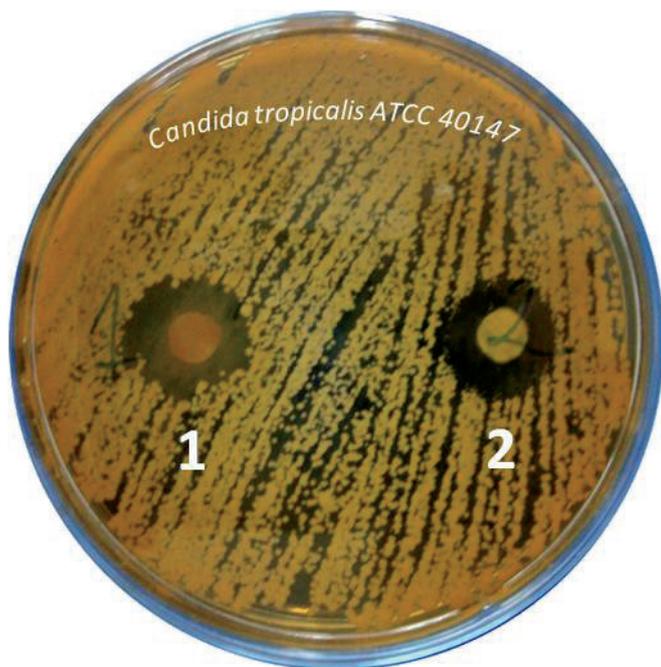


Figura 2. Halos de Inibição do crescimento de *C. tropicalis* promovidos pela tintura de Aroeira (1) e Controle Positivo (2).

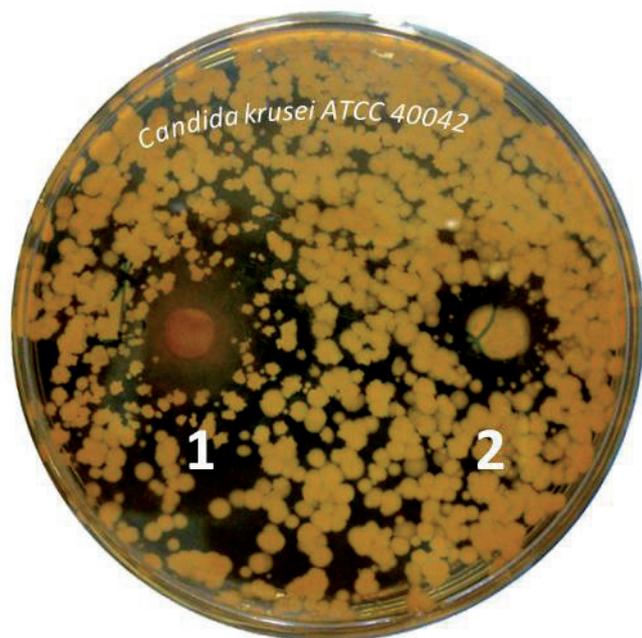


Figura 3. Halos de Inibição do crescimento de *C. krusei* promovidos pela tintura de Aroeira (1) e Controle Positivo (2).

DISCUSSÃO

A candidose oral é uma das condições patológicas mais comuns que afetam a mucosa oral²¹. Diante disso, o estudo de microrganismos que podem estar relacionados a esta condição, como *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*¹ se faz cada vez mais necessário.

Guerra *et al.*¹² (2000), avaliaram a atividade antimicrobiana de diferentes concentrações de um extrato etanólico de folhas de *Schinus terebinthifolius* Raddi frente a *C. albicans*. Nas concen-

trações de 80, 60, 40, 30 e 15%, obtiveram, respectivamente, os seguintes diâmetros de halos de inibição de crescimento fúngico (em mm): 25,3; 23,3; 22,3; 21,4 e 19,2.

Em nosso estudo, avaliamos a ação da tintura da casca de *Schinus terebinthifolius*, a 10%, frente a *C. albicans*, obtendo média dos diâmetros dos halos de inibição de 25,32 mm promovidos pela Aroeira em relação à 33,32 mm referentes ao controle.

Alves *et al.*²² (2009), encontraram atividade antifúngica *in vitro* do extrato hidroalcoólico da aroeira frente a *C. albicans*, com concentração inibitória mínima (CIM) de 1:8 e frente a *C. tropicalis* e *C. krusei*, com CIM de 1:16.

Os resultados do presente estudo mostram que a aroeira promoveu inibição no crescimento da levedura de *Candida tropicalis* em zonas com diâmetro de 25,32 mm. Ao passo que, frente a *C. krusei*, os resultados foram ainda mais expressivos, com halos de 26,66 mm de diâmetro.

Esses achados apresentam importância insofismável, pois as espécies de *Candida* avaliadas neste estudo têm sido detectadas como patogênicas nos casos de candidose oral, principalmente em pacientes imunocomprometidos^{1,23,24}.

Além do potencial antifúngico, a aroeira tem apresentado outras atividades biológicas, mediante inibição da aderência e crescimento de bactérias formadoras do biofilme dentário, como *Streptococcus mutans*^{11,22}. Alves *et al.*²² (2009) confirmaram, *in vitro*, as atividades bacteriostática e bactericida da aroeira frente a *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sanguis* e *Lactobacillus casei*.

Estudo identificou atividade antibacteriana (frente *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*), antifúngica (frente a *Candida albicans*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus flavus*) e atividade antioxidante do óleo essencial das folhas de Aroeira em diferentes concentrações¹³.

Em relação a análises fitoquímicas, que objetivam identificar os princípios bioativos das plantas, já foram isolados diversos compostos do gênero *Schinus* sp, e em especial da espécie *Schinus terebinthifolius*, como triterpenos^{4,25}, flavonóides, esteróides, taninos⁴ e um inibidor da secreção de fosfolipase A2²⁶. Além disso, extratos de *S. terebinthifolius* apresentaram atividade antirradicalar em ensaios de peroxidação lipídica e de captura de radical orgânico DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)²⁷.

Ceruks *et al.*²⁸ (2007) realizaram o fracionamento cromatográfico do extrato em etanol das folhas de *S. terebinthifolius*, guiado pelo ensaio para detecção do potencial antirradicalar, resultando no isolamento de cinco compostos fenólicos ativos.

Estudos *in vitro*, principalmente avaliando atividade antimicrobiana, apresentam-se como preliminares numa sequência desde ensaios microbiológicos até a fase clínica.

A técnica de difusão em ágar utilizada neste estudo trata-se de um ensaio inicial e tem a vantagem de gerar informações prévias sobre a ação de determinado produto, fornecendo, principalmente, dados qualitativos. No entanto, devido à natureza química (lipofílica ou hidrofílica) dos produtos naturais, nem sempre ocorre a difusão uniforme destas substâncias através do meio contendo ágar²⁹.

Os resultados desta pesquisa propiciam a continuidade dos estudos sobre *S. terebinthifolius*, levando-se em consideração suas potenciais atividades terapêuticas na Odontologia e a busca por novos compostos bioativos.

Sugere-se, pois, a realização de outros ensaios microbiológicos pré-clínicos, como cinética de morte microbiana, e toxicológicos, e a avaliação da eficácia clínica do produto em inibir o crescimento fúngico e bacteriano.

CONCLUSÃO

Nas condições desse estudo, a aroeira apresentou atividade antifúngica equivalente ao controle frente às cepas do gênero *Candida* avaliadas;

A cepa de *Candida krusei* apresentou-se mais susceptível à ação da tintura do que as demais;

Esses resultados mostram a importância das indicações terapêuticas do produto avaliado na clínica odontológica, como método alternativo e de baixo custo na prevenção e tratamento da candidose oral. Previamente, é imperativa a realização de outros estudos microbiológicos e clínicos para verificar a viabilidade de seu uso na odontologia.

REFERÊNCIAS

- Ten-Cate JM, Klis FM, Pereira-Cenci T, Crielaard W, Groot PWJ. Molecular and Cellular Mechanisms That Lead to Candida Biofilm Formation. *J Dent Res*. 2009;88(2):105-15.
- Koga-Ito CY, Lyon JP, Vidotto V, Resende MA. Virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida albicans* isolates from oral candidosis patients and control individuals. *Mycopathologia*. 2006;161:219-23.
- White SJ. Self-regulation of *Candida albicans* population size during GI colonization. *PLoS Pathog*. 2007;3(12):184.
- Johann S, Pizzolatti MG, Donnici CL, Resende MA. Antifungal properties of plants used in Brazilian traditional medicine against clinically relevant fungal pathogens. *Braz J Microbiol*. 2007;38:632-7.
- Sigurgeirsson B, Paul C, Curran D, Evans EGV. Prognostic factors of mycological cure following treatment of onychomycosis with oral antifungal agents. *Br J Dermatol*. 2002;147:1241-3.
- Soares MMSR, Cury AE. *In vitro* activity of antifungal and antiseptic agents against dermatophyte isolates from patients with tinea. *Braz J Microbiol*. 2001;32:130-4.
- Lupi EPV, Brizuela CIS, Jeifetz FC, Acosta CJS. Tamizaje de la actividad antifúngica de extractos de especies de la flora de Entre Ríos. *Rev Cuba Farm*. 2009;43(4):74-84.
- Agra MF, Freitas PF, Barbosa-Filho JM. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn*. 2007;17:114-20.
- Santos EB, Dantas GS, Santos HB, Diniz MFFM, Sampaio FC. Estudo etnobotânico de plantas medicinais para problemas bucais no município de João Pessoa, Brasil. *Rev Bras Farmacogn*. 2009;19:321-4.
- Branco Neto MLC, Ribas Filho JM, Malafaia O, Oliveira Filho MA, Czezko NG, Aoki S, et al. Avaliação do extrato hidroalcoólico de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) no processo de cicatrização de feridas em pele de ratos. *Acta Cir Bras*. 2006;21(Sup.2):17-22.
- Freires IA, Alves LA, Lima DMB, Souza TMPA, Almeida LFD, Jovito VC, et al. Atividades antibacteriana e antiaderente *in vitro* de tinturas de *Schinus terebinthifolius* (Aroeira) e *Solidago microglossa* (Arnica) frente a bactérias formadoras do biofilme dentário. *Odontol Clín-Cient*. 2010;9(2):139-43.
- Guerra MJM, Barreiro ML, Rodríguez ZM, Rubalcaba Y. Actividad antimicrobiana de un extracto fluido al 80 % de *Schinus terebinthifolius* Raddi (copal). *Rev Cuba Plant Med*. 2000;5(1):23-5.
- Gundidza M, Gweru N, Magwa ML, Mmbengwa V, Samie A. The chemical composition and biological activities of essential oil from the fresh leaves of *Schinus terebinthifolius* from Zimbabwe. *Afr J Biotechnol*. 2009;8(24):7164-69.
- Medeiros KCP, Monteiro JC, Diniz MFFM, Medeiros IA, Silva BA, Piuvezam MR. Effect of the activity of the Brazilian polyherbal formulation: *Eucalyptus globulus* Labill, *Peltodonradicans* Pohl and *Schinus terebinthifolius* Radd in inflammatory models. *Rev Bras Farmacogn*. 2007;17:23-8.
- Ribas MO, Sousa MH, Sartoretto J, Lanzoni TA, Noronha L, Acra LA. Efeito da *Schinus terebinthifolius* Raddi sobre o processo de reparo tecidual das lesões ulceradas induzidas na mucosa bucal do rato. *Rev Odontol Ciênc*. 2006;21(53):245-52.
- Soares DGS, Oliveira CB, Leal C, Drumond MRS, Padilha WWN. Atividade Antibacteriana *in vitro* da Tintura de Aroeira (*Schinus terebinthifolius*) na Descontaminação de Escovas Dentais Contaminadas pelo *S. mutans*. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr*. 2007;7(3):253-7.
- Soares DGS, Oliveira CB, Leal C, Drumond MRS, Padilha WWN. Susceptibilidade *in vitro* de bactérias bucais a tinturas fitoterápicas. *Rev Odontol Ciênc*. 2006;21(53):232-7.
- Baggio AJ. Aroeira como potencial para usos múltiplos na propriedade rural. *Boletim de Pesquisa Florestal*. 1988;17:25-32.
- Ferriter A. Brazilian Peppertree Management Plan for Florida. Florida: Brazilian Peppertree Task Force; 1997.
- Martinez MJ, Gonzalez AN, Badell BJ. Actividad antimicrobiana del *Schinus terebinthifolius* Raddi (copal). *Rev Cuba Plant Med*. 1996;1(3):37-9.
- Epstein JB. Antifungal therapy in oropharyngeal mycotic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1990;69:32-41.
- Alves PM, Queiroz LMG, Pereira JV, Pereira MSV. Atividade antimicrobiana, antiaderente e antifúngica *in vitro* de plantas medicinais brasileiras sobre microrganismos do biofilme dental e cepas do gênero *Candida*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2009;42(2):222-4.
- Marcos-Arias C, Vicente JL, Sahand IH, Eguia A, De-Juan A, Madariaga L, et al. Isolation of *Candida dubliniensis* in denture stomatitis. *Arch Oral Biol*. 2009;54:127-31.
- Samaranayake L. Commensal Oral *Candida* in Asian Cohorts. *Int J Oral Sci*. 2009;1(1):2-5.
- Jayr D, Campello P, Marsaioli AJ. Triterpenes of *Schinus terebinthifolius*. *Phytochemistry*. 1974;13(3):659-60.
- Mahendra K. Specific competitive inhibitor of secreted phospholipase A2 from berries of *Schinus terebinthifolius*. *Phytochemistry*. 1995;39(3):537-47.
- Velázquez E, Tournier HA, Buschiazzi PM, Saavedra G, Schinella GR. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. *Fitoterapia*. 2003;74:91-7.
- Ceruks M, Romoff P, Fávero OA, Lago JHG. Constituintes Fenólicos Polares de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). *Quim Nova*. 2007;30(3):597-9.
- Lambert RJW, Skandamis PN, Coote PJ. A Study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Applied Microbiol*. 2001;91:453-62.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the antifungal activity of *Schinus terebinthifolius* (aroeira) on *Candida albicans* (ATCC289065), *C. tropicalis* (ATCC40147) and *C. krusei* (ATCC40042). **Materials and Methods:** The antifungal activity test was performed through the diffusion technique on solid medium. In culture medium Sabouraud Dextrose Agar (HIMEDIA®, São Paulo, Brazil) were seeded the fungal strains by using swabs. Then, sterilized absorbent discs previously immersed in 50µL of Aroeira (10%) were inserted on the agar surface. As positive control, the discs were immersed in 50µL of Nystatin (1:100,000IU). Then, plates were conducted to an incubator at 37°C for 48 hours. The study was done in triplicate and statistically analyzed by Mann Whitney test. **Results:** Aroeira was responsible for the formation of ha-

los of growth inhibition of the three strains under study and no statistically significant difference has been found between the product and the control. In relation to *C. albicans*, were found the largest inhibition zones of 16mm for aroeira and 18mm for the control ($p=0.1642$). Against *C. tropicalis*, the largest halos were of 16mm for aroeira and 18mm for the control ($p=0.8248$). On *C. krusei*, were verified halos of 14mm for both the product and control ($p=0.6193$). **Conclusion:** Aroeira has showed antifungal activity equivalent to the control on the *Candida* strains evaluated. Thus, it is suggested to carry out further microbiological, toxicological and clinical studies to verify the feasibility of its use in dentistry.

KEYWORDS: Anacardiaceae, *candida albicans*, *candida tropicalis*, natural products.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Ricardo Dias de CASTRO
Universidade Federal da Paraíba. Campus Universitário I
Cidade Universitária, João Pessoa, Paraíba. CEP 58059-900
Departamento de Clínica e Odontologia Social – DCOS.
E-mail: ricardodiasdecastro@yahoo.com.br.
Telefone: (83) 9317-1071