



Isolamento e caracterização de cepas de *Candida* sp. em pacientes do município de Iranduba-AM e sua susceptibilidade ao extrato de *Psidium guajava* Linn

Thais Cristina Ferreira Corrêa¹, Fábio Raphael Moreira Cáuper², Gabriela Hermida Dias³, Luciana Lima de Brito Cáuper⁴, Suely De Souza Costa⁵, Vanda Santana Queiroz Dini⁶

Resumo

Devido aos problemas ocasionados pelo fungo do gênero *Candida* da mucosa vaginal em pacientes atendidas em uma UBS na cidade de Iranduba – Amazonas, este trabalho teve como objetivos isolar e identificar as espécies de *Candida* sp. envolvidas em processo de candidíase vulvovaginal, testar a atividade de enzimas extracelulares fosfolipase e proteinase, bem como avaliar a susceptibilidade desses micro-organismos ao extrato produzido a partir de folhas de *Psidium guajava* Linn. (goiabeira). Participaram do presente estudo 50 pacientes do gênero feminino, com idades entre 12 e 80 anos. As leveduras do gênero *Candida* estavam presentes em 29 (58%) das amostras estudadas. Para o isolamento e identificação dos micro-organismos foram utilizados os meios de cultura Ágar Sabouraud Dextrose e CHROMagar, respectivamente. Os testes de susceptibilidade e de atividade enzimática foram realizados em 24 amostras de *Candida* sp. Os resultados demonstraram que todas as cepas do gênero *Candida* foram produtoras de proteinase e fosfolipase sendo positivas e fortemente positivas. Quanto à susceptibilidade do extrato, a CIM foi determinada na diluição 1:2 para *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e para *C. glabrata* a CIM foi 1:8, apresentando potencial antifúngico *in vitro* satisfatório.

Palavras-Chave: Candidíase vulvovaginal, atividade antifúngica, atividade enzimática.

Isolation and characterization of *Candida* sp. in patients from the municipality of Iranduba-AM and their susceptibility to the extract of *Psidium guajava* Linn. Due to the problems caused by the fungus *Candida* genus of the vaginal mucosa in patients attended at a UBS in the city of Iranduba - Amazonas, this work had as objectives to isolate and identify the species of *Candida* sp. involved in the process of vulvovaginal candidiasis, to test the activity of extracellular enzymes phospholipase and proteinase, as well as to evaluate the susceptibility of these microorganisms to the extract produced from leaves of *Psidium guajava* Linn. (guava). Fifty female patients, aged between 12 and 80 years, participated in the study. *Candida* yeasts were present in 29 (58%) of the samples studied. For the isolation and identification of the microorganisms the culture media Sabouraud Agar Dextrose and CHROMagar, respectively, were used. The susceptibility and enzymatic activity tests were performed on 24 samples of *Candida* sp. The results demonstrated that all strains of the genus *Candida* were proteinase and phospholipase producers being positive and strongly positive. Regarding the susceptibility of the extract, the MIC was determined at the 1: 2 dilution for *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* and for *C. glabrata* MIC was 1: 8, presenting satisfactory *in vitro* antifungal potential.

Key-words: Vulvovaginal candidiasis, antifungal activity, enzymatic activity

¹ Bacharel pelo curso de Farmácia da Universidade Paulista (UNIP), cfcsiaht@gmail.com

² Doutorando pelo Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), fabio.cauper@gmail.com

³ Graduanda do curso de Enfermagem da Universidade Paulista (UNIP), gabyhermida86@gmail.com

⁴ Doutora pelo Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), luci_brito@hotmail.com

⁵ Pesquisador Titular III do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), sscosta@inpa.gov.br

⁶ Doutoranda pelo Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), vanda_santana@hotmail.com



1. Introdução

O gênero *Candida* pertence ao Reino Fungi, grupo Eumycose Blastomycetes e faz parte da família Criptococcacea. As principais espécies de interesse clínico neste gênero são *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* (CAMARGO et al., 2008). Esses micro-organismos podem ser encontrados em variados ecossistemas, como solo, alimentos e água. Fazendo parte da microbiota de homens e animais, sendo conhecidos por degradarem proteínas e carboidratos para obterem carbono e nitrogênio, e devido a sua capacidade adaptativa, se desenvolvem tanto na presença de oxigênio quanto em anaerobiose (GIOLO & SVIDZINSKI, 2010).

Dentre as centenas de espécies descritas, as leveduras do gênero *Candida* são consideradas importantes agentes de infecção relacionados à assistência à saúde e representam um desafio para a sobrevivência de pacientes com doenças graves, ou aqueles em período pós-operatório. Hospitais norte-americanos, com sistema de vigilância operante, notificaram espécies de *Candida* como sendo o 6º patógeno mais frequente em infecção nosocomial e a 4ª causa mais comum de infecções de corrente sanguínea, adquiridas em hospitais. (ANVISA 2013; ANVISA, 2004).

Entre as espécies mais frequentemente isoladas de candidose estão *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*. Além destas espécies, diferentes amostras clínicas isoladas apresentam *C. parapsilosis*, *C. stellatoidea*, *C. guilliermondii* e *C. krusei*. O principal patógeno humano do gênero *Candida* é *C. albicans*, considerado um fungo oportunista patogênico. Sua habilidade em causar doença está mais relacionada ao estado imunológico do hospedeiro do que aos reconhecidos fatores de virulência (CANABARRO et al., 2009).

A patogenicidade das espécies fúngicas depende de alguns fatores de virulência, como a capacidade de crescer a 37°C, a qual permite um bom desenvolvimento no corpo humano da formação de hifas e pseudohifas, as quais representam um obstáculo para a fagocitose e permitem a fixação da levedura nos epitélios. A produção de fosfolipases e de proteinases auxiliam na aderência da levedura na mucosa do hospedeiro, facilitam a invasão fúngica e as ações que

promovem a depressão da imunidade (CAMARGO et al., 2008).

Uma micose oportunista primária ou secundária, endógena ou exógena, reconhecida como doença sexualmente transmissível (DST), levam a lesões que podem variar de superficiais a profundas; brandas, agudas ou crônicas; envolvendo diversos sítios, tais como boca, garganta, língua, pele, couro cabeludo, genitálias, dedos, unhas e por vezes órgãos internos (BARBEDO; SGARBI, 2010).

Vários fatores de virulência de *Candida* sp. já foram descritos, como a produção de enzimas extracelulares fosfolipase e proteinase. A secreção de proteinases ocorre pelos genes denominados *Secreted aspartyl proteinases* (*Saps*), muito importantes e bem conhecidos em *Candida albicans*, pois facilitam a invasão e colonização de tecidos dos hospedeiros pela ruptura das mucosas e degradam importantes proteínas de defesa imunológica e estrutural, como albumina, hemoglobina, queratina, colágeno, mucina, lactoferrina, lactoperoxidase e imunoglobulinas como as da classe IgA. Já foram identificados dez genes *Saps* em *C. albicans*, quatro em *C. tropicalis*, três em *C. parapsilosis* e nenhum em *C. glabrata* e em outras espécies (BRANCO et al., 2012).

As fosfolipases pertencem a uma família de enzimas capazes de degradar diversos tipos de substratos fisiologicamente importantes, tais como componentes celulares da mucosa. Estas enzimas extracelulares desempenham um papel importante na invasão dos tecidos, caracterizada pela desintegração das membranas epiteliais, fato que facilita a ancoragem da hifa para dentro do citoplasma da célula (ANDREOLA et al., 2016). As enzimas categorizadas como fosfolipases (PLs, do inglês phospholipases) também são consideradas fatores de patogenicidade em *Candida* sp. PLs são enzimas que hidrolisam os fosfolipídios e os ácidos graxos. Vários estudos já mostraram que espécies de *Candida* não *albicans* (CNA) são capazes de produzir fosfolipases extracelulares (BRANCO et al., 2012).

A planta *Psidium guajava*, 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, disenteria e



dor de barriga (VENDRUSCOLO et al., 2005; TÔRRES et al., 2005). Segundo algumas pesquisas realizadas no Brasil, país detentor de uma grande biodiversidade, a goiaba vermelha, *Psidium guajava*, poderia ser utilizada como alternativa terapêutica em infecções fúngicas (ALVES et al., 2006; ALVES et al., 2009).

A região amazônica, além de possuir grande biodiversidade, também é o habitat de um considerável contingente populacional humano. Embora grande parte desse contingente esteja concentrado nas áreas urbanas, milhões de pessoas, incluindo populações indígenas e ribeirinhas, vivem nas áreas rurais mais distantes onde o acesso à saúde é dificultado devido à geografia topografia da região. Considerando que a *Psidium guajava* (goiabeira) é comum em países de clima tropical, facilitando o acesso à população e o extrato é de baixo custo, a folha da goiabeira pode ser utilizada como meio alternativo no tratamento da candidíase, ainda buscando a sua melhor forma farmacêutica para o seu uso farmacológico adequado.

Via de regra, a quantidade de leveduras na lesão é geralmente alta e, frequentemente, mais de uma espécie é isolada. Em função do grande número de mulheres atendidas com vulvovaginite na área ginecológica das clínicas das redes de saúde do estado, com queixas de irritação vaginal, coceira intensa e corrimento vaginal, como também do crescente interesse pelos mecanismos de virulência de *Candida*, surgiu o interesse em identificar as espécies envolvidas em processos inflamatórios da vagina em pacientes atendidas nas policlínicas de rede pública.

O objetivo do trabalho foi isolar, identificar e estimar a frequência de espécies de *Candida sp.* envolvidas em processos de candidíase vulvovaginal, bem como avaliar *in vitro* a atividade antifúngica do extrato da folha da *Psidium guajava* Linn. (goiabeira), através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em estudo comparativo com o gluconato de clorexidina à 0,12%. Também foi avaliada a atividade de enzimas extracelulares fosfolipase e proteinase produzidas pelas mesmas amostras isoladas.

2. Material e Método

2.1 Coleta do material

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade

Paulista UNIP/Manaus, sob protocolo CAEE 50785315.3.0000.5512.

Participaram do presente estudo 50 pacientes do gênero feminino, com idades entre 12 e 80 anos. Todas as pacientes foram previamente elucidadas quanto ao projeto de pesquisa, através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e ficha de dados clínico, com suas identidades mantidas em sigilo. As amostras de *Candida sp.* foram coletadas pelo profissional médico ginecologista em mulheres que estavam recebendo atendimento ginecológico de rotina em uma Unidade Básica de Saúde no município de Iranduba – Amazonas, independentemente de apresentarem ou não sintomas de candidíase Vulvovaginal. A coleta foi realizada no canal vaginal externo, com auxílio de Swab estéril, após a coleta, as amostras foram transportadas, em meio salino, para o Laboratório de análises clínicas da Universidade Paulista UNIP/Manaus.

2.2 Crescimento, isolamento e identificação dos micro-organismos

Para o crescimento dos fungos foi utilizado o meio ágar Sabouraud dextrose, onde as amostras foram incubadas a 37°C por um período de 24-48 horas em tubos de ensaio contendo o meio de cultura. Em seguida foi utilizado o meio CHROMagar *Candida*® (Paris, França) nas mesmas condições de temperatura por um período de até sete dias, em placas de Petri, onde foi observada a morfologia característica das colônias, conforme Tabela 1.

Tabela 1 – Cor e morfologia das colônias de *Candida* em CHROMagar *Candida* segundo instruções do fabricante.

Cor típica da colônia	Micro-organismos pré-identificado
Verde	<i>C. albicans</i>
Azul metálico	<i>C. tropicalis</i>
Roxo	<i>C. glabrata</i>
Rosa, rugosa	<i>C. krusei</i>
Branca a rosa	Outras espécies

2.3 Preparação do extrato de *Psidium guajava* Linn.

Após terem sido coletadas, as amostras de *Psidium guajava* Linn. (goiabeira) foram identificadas e inseridas na coleção do herbário do

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), com número de tombamento INPA-279.374.

Para a obtenção dos extratos vegetais, foi realizada metodologia descrita por Alves et al (2006), onde as folhas foram lavadas com água corrente e posteriormente separadas as matérias-primas a serem utilizadas na pesquisa. Em seguida a matéria-prima foi levada à secagem em estufa a 33°C, durante 22 horas, para eliminação de umidade e estabilização do material. Passado este período a matéria-prima foi retirada da estufa, triturada a pó em moinho elétrico e então submetida a processo de extração dos princípios ativos. Por se tratar de uma matéria rica em polifenóis de fácil modificação estrutural, não foi utilizada a extração à quente, preservando assim a estabilidade do material. O método de extração empregado foi a lixiviação ou percolação em fluxo contínuo à temperatura ambiente. Esta etapa ocorreu em um período de 24 horas, e uma preparação hidroalcoólica a 80% v/v utilizado como solução extratora.

Após este tempo, o marco fica completamente esgotado (extração total dos marcadores ou princípios ativos). Nesta etapa, foram utilizadas aproximadamente 106,6 mL de solução hidroalcoólica para 20 g de matéria-prima seca e pulverizada, visando o completo esgotamento da droga.

A concentração da solução de extrato padrão (em nível de extrato fluido 1:1 p/v) foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Alves, et al (2006), utilizando rotavapor a temperatura constante de 45°C.

2.4 Montagem do experimento para a determinação da atividade antifúngica de *Psidium guajava* Linn.

A atividade antifúngica foi determinada pelo método de difusão em meio sólido para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). As cepas foram reativadas em caldo Sabouraud Dextrose a 37°C e estocadas em ágar Sabouraud Dextrose 4%. Para a condução do estudo, suspensões fúngicas dos micro-organismos foram preparadas em solução salina, sob a concentração $1,5 \times 10^8$ UFC/mL na escala de 0,5, comparável ao tubo a 10^8 da escala de MacFarland. Foram realizadas perfurações de

aproximadamente 6 mm de diâmetro no meio de cultura ágar Sabouraud Dextrose 4% depositadas em placas de petri. Nestes orifícios foi colocado um volume de 50 µL da solução da escala do extrato diluído, variando da diluição 1:1 até 1:32, em água estéril. Os testes foram realizados em duplicata (Figura 1).

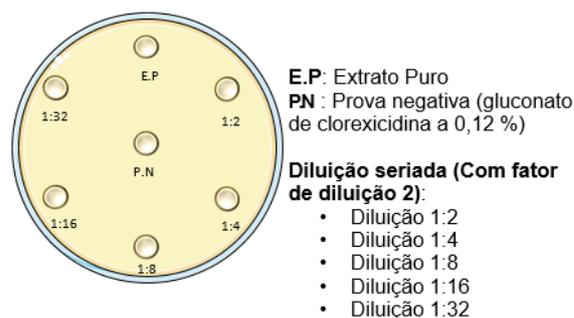


Figura 1 – Representação esquemática da distribuição dos orifícios para o acondicionamento do extrato das folhas de *Psidium guajava* Linn. em placa de petri.

As placas foram incubadas em estufa a 37°C por um período de 24-48 horas. A medição de cada halo foi calculada através da média igual ao diâmetro horizontal mais o diâmetro vertical dividido por dois (conforme a fórmula). (CAVALCANTI, et al. 2011; ALVES, et al, 2006. Com adaptações).

$$\bar{X} = \frac{DH + DV}{2}$$

2.5 Determinação da atividade enzimática de *Candida* sp.

A detecção da atividade enzimática foi realizada segundo a técnica de Camargo et al (2008), no qual os isolados foram submetidos à pesquisa de enzimas fosfolipase e proteinase. Foram utilizados os meios de cultura ágar proteinase (extrato de levedura 11,7 g; albumina bovina 2 g; protovit 3 gotas, ágar 18 g e H₂O 1000 mL) e ágar fosfolipase (ágar Sabouraud 65 g; NaCl 57,3 g; CaCl₂ 0,55 g; gema de ovo 40 g e H₂O 1000 mL). A padronização da concentração da solução de micro-organismos utilizada nos testes foi feita equivalente a 1 na escala de MacFarland, posteriormente foram inoculadas em ponto central das placas contendo os meios. Os inóculos de cultivos permaneceram incubados a

37°C, durante sete dias para proteinase e quatro dias para fosfolipase.

A presença da atividade da proteinase e da fosfolipase foi verificada pela formação de um halo transparente ou opaco ao redor da colônia, respectivamente. A atividade enzimática (Pz) foi obtida por meio da razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro da colônia mais a zona de precipitação, onde $Pz = 1$ é negativo, $Pz > 0,64$ e < 1 é positivo e $Pz \leq 0,63$ é fortemente positivo.

2.6 Análises estatísticas

Os ensaios foram realizados com análise de variância (ANOVA), pelo teste F, quando significativo, as comparações de médias foram realizadas pelo teste de Tukey, todos os testes realizados ao nível de 5% de probabilidade.

3. Resultados e Discussão

3.1 Frequência de *Candida* sp. nas amostras coletadas

As leveduras do gênero *Candida* estavam presentes em 29 amostras coletadas (58%). As mesmas foram identificadas utilizando o meio de cultura CHROMagar *Candida*, sendo 12 *C. albicans*, 5 *C. krusei*, 5 *C. glabrata*, 4 *C. tropicalis* e 3 como *Candida* spp., conforme a (Figura 2).

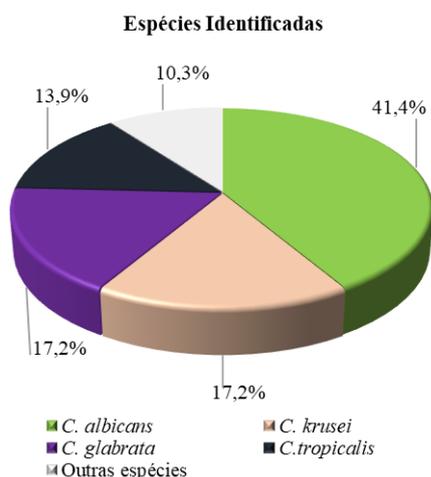


Figura 2 – Percentual das espécies de *Candida* sp. encontradas em todas as amostras.

Dentre as 29 amostras citadas, 24 delas apresentaram uma única espécie de levedura (82,8%) e apenas 5 apresentaram mais de uma espécie (17,2%), conforme a (figura 3). Foram utilizados para os testes de susceptibilidade ao extrato de *Psidium guajava* Linn. e atividade de enzimas

extracelulares fosfolipase e proteinase apenas as 24 amostras contendo uma única espécie.

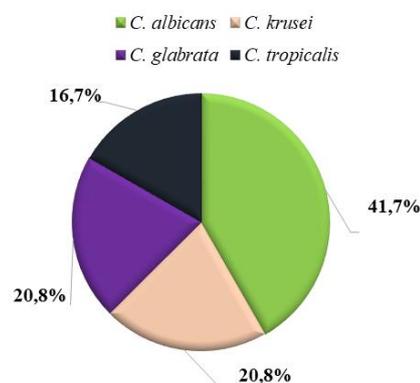


Figura 3 – Frequência das espécies de *Candida* sp. encontradas por amostra. Essas mesmas amostras apresentaram apenas uma única espécie de levedura.

Dentre as espécies isoladas, *C. albicans* foi a mais frequente apresentando 41,7%. Esses resultados são semelhantes aos descritos por Barberdo e Sgarbi (2010), quando esses relataram que uma vez que esta levedura faz parte da microbiota humana, ela é considerada uma micose oportunista e representa 60% dos isolados de amostras clínicas. No estudo de Andreola et al (2016), isolou-se cepas da cavidade oral de humanos no qual mostrou a determinação das espécies identificadas pelo meio CHROMagar *Candida*, onde houve predomínio da *C. albicans*, a qual foi identificada em 27 casos representando 77%. Em nosso estudo houve baixa prevalência de espécies não *albicans*, evidenciando que *C. albicans* é a espécie mais frequente dentre as amostras coletadas no quadro da candidíase.

3.2 Susceptibilidade ao extrato

Os testes de suscetibilidade das espécies de *Candida* sp. ao extrato de *Psidium guajava* Linn. demonstraram que todas as amostras apresentaram susceptibilidade nas concentrações de 1:1 (extrato puro) e 1:2, mostrando que houve atividade antifúngica satisfatória, havendo variações nas outras diluições entre as espécies testadas.

A análise da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi relacionada quanto ao nível do extrato puro e suas escalas de diluições conforme tabela 2, e quanto a comparação entre o antifúngico comercial (gluconato de clorexidina a

0,12%) com o extrato puro e suas diluições com o conforme Figuras 4, 5, 6 e 7.

Tabela 2 – Distribuição do perfil de susceptibilidade das espécies de *Candida* sp. mediante as diferentes concentrações de extrato.

Diluição	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. krusei</i>
Extrato puro*	2.3600 0 a	2.2000 0 a	2.650 00 a	2.1300 a
1:2	1.8475 0 b	1.5750 0 ab	1.806 25 ab	1.4900 0 ab
1:4	1.3475 0c	1.3950 0 ab	1.112 50 bc	1.1450 b
1:8	1.1075 0 cd	1.2100 0 bc	1.075 00 bc	0.8500 bc
1:16	0.8125 0 de	0.7750 0 bc	1.025 00 bc	0.3350 cd
1:32	0.5850 0 e	0.4000 0 c	0.750 00 c	0.0000 d
Prova negativa*	1.5100 0 bc	1.1750 0 bc	1.543 75 bc	1.1550 0 b

*Extrato puro feito com folha de *Psidium guajava* Linn.

*Prova negativa feito com gluconato de clorexidina a 0,12%.

Conforme visto na tabela 2, as médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. O estudo comparativo entre o extrato puro e suas escalas de diluições segundo o teste de Tukey determina que na espécie *C. albicans*, o extrato puro diferiu das demais escalas de diluições e da prova negativa. A prova negativa não diferiu da diluição 1:2. A diluição 1:4 e 1:8 não diferiram entre si, sendo a CIM a diluição 1:8. As diluições 1:16 e 1:32 foram insatisfatórias. Para os testes de susceptibilidade de *C. glabrata*, o extrato puro não diferiu das diluições 1:2 e 1:4. A prova negativa não diferiu das diluições 1:8 e 1:16. Sendo a CIM a diluição 1:16. A diluição 1:32 foi insatisfatória. Para os testes de susceptibilidade de *C. tropicalis*, o extrato puro não diferiu da diluição 1:2. A prova negativa não diferiu das diluições 1:4; 1:8 e 1:16. Sendo a CIM a diluição 1:16. A diluição 1:32 foi insatisfatória. Para os testes de susceptibilidade de *C. krusei*, o

extrato puro não diferiu da diluição 1:2. A prova negativa não diferiu das diluições 1:4 e 1:8. Sendo a CIM a diluição 1:8. As diluições 1:16 e 1:32 foram insatisfatórias.

O estudo comparativo entre o antifúngico comercial (gluconato de clorexidina a 0,12%) e o extrato de *Psidium guajava* Linn. e suas escalas de diluições para determinação da CIM demonstraram que nas espécies *C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis* a CIM foi determinada na diluição 1:2 conforme figuras 4, 5 e 6. Na espécie *glabrata* a CIM foi determinada na diluição 1:8 conforme Figura 7.

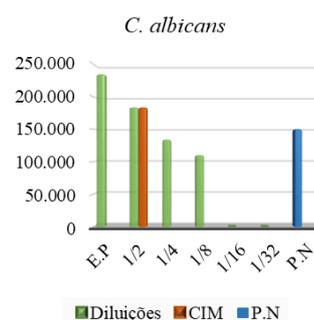


Figura 4 – Distribuição do perfil de susceptibilidade das espécies de *C. albicans* mediante a comparação com a prova negativa gluconato de clorexidina a 0,12% (antifúngico comercial). No eixo “Y”, valores obtidos por meio do teste de Tukey.

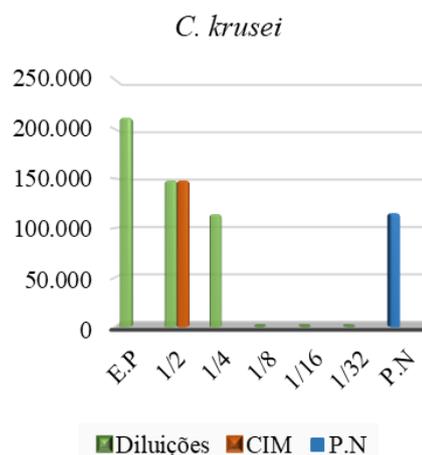


Figura 5 – Distribuição do perfil de susceptibilidade das espécies de *C. krusei* mediante a comparação com a prova negativa gluconato de clorexidina a 0,12% (antifúngico comercial). No eixo “Y”, valores obtidos por meio do teste de Tukey.

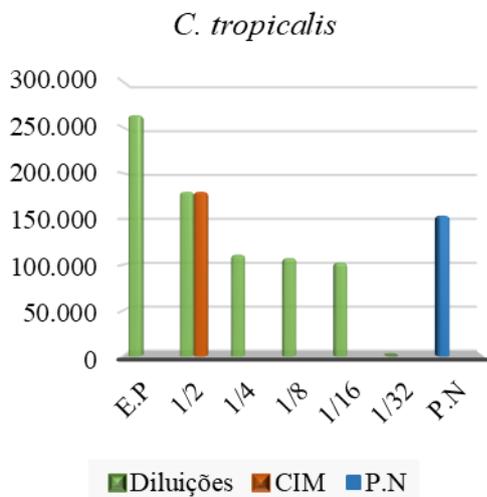


Figura 6 – Distribuição do perfil de susceptibilidade das espécies de *C. tropicalis* mediante a comparação com a prova negativa gluconato de clorexidina a 0,12% (antifúngico comercial). No eixo “Y”, valores obtidos por meio do teste de Tukey.

Diante das análises dos resultados *in vitro* fase pré-clínica, obteve-se um resultado satisfatório mediante as análises comparativas realizadas, onde as cepas do gênero *Candida* apresentaram sensibilidade ao extrato puro e suas escalas de diluições em todas as cepas analisadas variando a CIM entre a diluição 1:8 e 1:16, e quando comparado ao antifúngico comercial (gluconato de clorexidina a 0,12%) a CIM foi nas diluições 1:2 e 1:8.

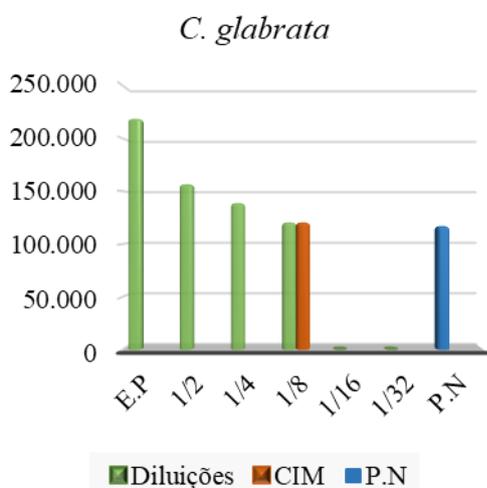


Figura 7 – Distribuição do perfil de susceptibilidade das espécies de *C. glabrata* mediante a comparação com a prova negativa gluconato de clorexidina a 0,12% (antifúngico comercial). No eixo “Y”, valores obtidos por meio do teste de Tukey.

Os resultados obtidos corroboram com os descritos por Alves et al (2006), quando estes analisaram cepas de *Candida* sp. da cavidade oral de humanos. Esses relataram que o extrato da goiabeira inibiu, até a concentração de 1:32, o crescimento de todas as cepas de *C. albicans* e *C. tropicalis* analisadas. Todavia, no mesmo estudo, as leveduras *C. stellatoidea* e *C. krusei* apresentaram sensibilidade apenas nas maiores concentrações.

Os resultados descritos no presente trabalho demonstram que espécimes de *C. albicans* provenientes da mucosa vaginal apresentam menor susceptibilidade ao extrato testado quando comparadas a amostras coletadas da cavidade oral. Em relação aos resultados obtidos com as amostras de *C. tropicalis*, nosso estudo mostra a CIM em 1:16, tendo susceptibilidade semelhante ao descrito por Alves et al (2006), no entanto *C. krusei* provenientes da mucosa vaginal apresentam maior susceptibilidade ao extrato testado quando comparadas a amostras coletadas da cavidade oral.

No estudo realizado por Fonseca e Botelho (2010), espécies do gênero *Candida* (*C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis*.) foram testadas frente à solução hidroalcoólica de *P. guajava*. O teste de sensibilidade com a solução hidroalcoólica apresentou atividade antimicrobiana em todas as amostras testadas. Entretanto, Menezes et al (2009) realizou outro estudo onde avaliou vários extratos de plantas da Amazônia frente à inibição de *C. albicans* e observou que apenas o extrato de *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia) apresentou atividade antifúngica satisfatória. Os extratos de *P. guajava* apresentou atividade antifúngica moderada. Outros extratos testados não apresentaram atividade antifúngica, como: *Annona glabra*, *Azadiractha indica*, *Bryophyllum calycinum* e *Mammea americana*.

O estudo de Fonseca e Botelho (2010), foi símile ao nosso, uma vez que as mesmas espécies de *Candida* apresentaram sensibilidade antimicrobiana frente ao extrato de *Psidium guajava*. No entanto, o estudo realizado por Menezes et al (2009), expõe que a atividade antifúngica de *Psidium guajava* foi moderada frente as cepas de *Candida* sp. o que faz ser avesso ao nosso estudo, uma vez que todas as

cepas de *Candida* obtiveram sensibilidade satisfatória ao extrato da folha de goiabeira.

Cavalcanti et al (2012), utilizou óleos essenciais de *C. aurantium*, *C. limmom*, *C. reticulata*, *X. brasiliensis*, *C. xanthocarpa*, *O. basilicum* e *C. martinii* para avaliação antifúngica *in vitro*. O ensaio para verificação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais foi realizado sobre as cepas de *Candida* sp., onde apontaram o efeito inibitório desejado, sendo de grande relevância novos estudos frente as plantas medicinais, nas quais possuem grande finalidade terapêutica no combate a micro-organismos patogênicos.

Freire et al (2016), discorre sobre que o território brasileiro que possui cerca de 20% da biodiversidade mundial, incluindo plantas, que servem como matéria-prima para a produção de medicamentos fitoterápicos e outros. A grande diversidade cultural e étnica do Brasil é responsável pelo conhecimento transmitido ao longo de gerações sobre a gestão e uso de plantas medicinais. Considerando a resistência das leveduras pertencentes ao gênero *Candida* frente aos antifúngicos atualmente utilizados, pode-se inferir que a busca de novos compostos antifúngicos de origem vegetal mostra-se de relevante significância. Há a necessidade de realização de estudos de cunho toxicológico e clínico como suporte de segurança para o uso destes produtos como fármacos.

Estudos indicam que a goiaba vermelha, *Psidium guajava*, poderia ser utilizada como alternativa terapêutica em infecções fúngicas (ALVES et al., 2009), uma vez que é de fácil acesso à população, e altamente rica nas regiões de clima tropical, esta espécie de planta tem potencial para ser utilizada contra as cepas de *Candida* sp. No entanto, mais avaliações farmacológicas devem ser realizadas, desenvolvendo o estudo clínico com objetivo de estabelecer uma evolução preliminar da segurança e do perfil farmacocinético e farmacodinâmico da substância analisada.

3.3 Atividade de fosfolipase e proteinase de espécies de *Candida* spp.

Das 24 amostras analisadas, todas apresentaram atividade enzimática positiva, com Pz variando entre 0,8 e 0,9 para os dois substratos testados. Sendo classificadas como positivas e fortemente positivas. As cepas produtoras de

fosfolipase obtiveram 9 positivas e 15 fortemente positivas. *C. albicans* obteve 3 amostras positivas e 7 fortemente positivas. *C. krusei* obteve 2 positivas e 3 fortemente positivas. *C. glabrata* obteve 2 positivas e 3 fortemente positivas e *C. tropicalis* obteve 2 positiva e 2 fortemente positivas. Das produtoras de proteinase 14 foram positivas e 10 fortemente positivas. *C. albicans* obteve 6 amostras positivas e 4 fortemente positivas. *C. krusei* obteve 2 positivas e 3 fortemente positivas. *C. glabrata* obteve 3 positivas e 2 fortemente positivas e *C. tropicalis* obteve 3 positiva e 1 fortemente positivas, conforme Tabela 3 e Figura 8.

Tabela 3 – Valores de Pz para Proteinase e Fosfolipase.

Espécie	Amostras	Valor Pz F ¹	Valor Pz P ²
<i>C. albicans</i>	1	0,50	0,50
<i>C. albicans</i>	2	0,70	0,80
<i>C. albicans</i>	3	0,60	0,70
<i>C. albicans</i>	4	0,60	0,70
<i>C. albicans</i>	5	0,80	0,70
<i>C. albicans</i>	6	0,50	0,20
<i>C. albicans</i>	7	0,30	0,50
<i>C. albicans</i>	8	0,30	0,70
<i>C. albicans</i>	9	0,50	0,30
<i>C. albicans</i>	10	0,70	0,70
<i>C. krusei</i>	1	0,70	0,70
<i>C. krusei</i>	2	0,60	0,20
<i>C. krusei</i>	3	0,60	0,60
<i>C. krusei</i>	4	0,60	0,70
<i>C. krusei</i>	5	0,80	0,60
<i>C. glabrata</i>	1	0,60	0,75
<i>C. glabrata</i>	2	0,60	0,60
<i>C. glabrata</i>	3	0,70	0,90
<i>C. glabrata</i>	4	0,70	0,70
<i>C. glabrata</i>	5	0,60	0,2
<i>C. tropicalis</i>	1	0,60	0,70
<i>C. tropicalis</i>	2	0,8	0,8
<i>C. tropicalis</i>	3	0,60	0,55
<i>C. tropicalis</i>	4	0,70	0,70

¹ Valor Pz fosfolipase, ² Valor Pz proteinase

O perfil de prevalência encontrado nas espécies de *Candida* sp. em nosso estudo demonstrou resultados semelhantes aos descritos por Camargo et al (2008), que realizou testes enzimáticos em cepas do gênero *Candida* da mucosa vaginal, onde verificou-se 9 amostras produtoras de proteinase e 11 de fosfolipase, incluindo as espécies *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*, com Pz variando entre 0,31 e 0,79. Houve atividade enzimática positiva e fortemente positiva

nas espécies de *C. albicans* e *C. tropicalis*, levando em consideração que as cepas de *C. krusei* e *C. glabrata* foram negativas com Pz igual a 1, afirmando que os resultados negativos para *C. krusei* e *C. glabrata* foram esperados devido essas espécies não serem produtoras dessas enzimas.

- PROTEINASE FORTEMENTE POSITIVA
- PROTEINASE POSITIVA
- FOSFOLIPASE FORTEMENTE POSITIVA
- FOSFOLIPASE POSITIVA

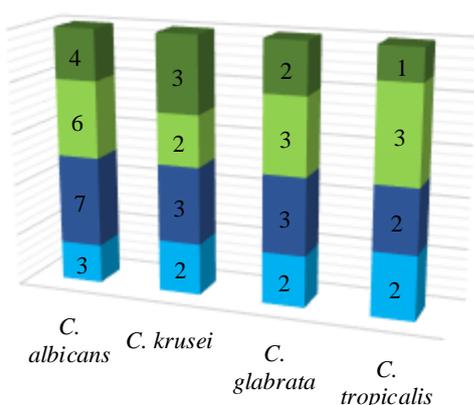


Figura 8 – Valores de Pz positivos e fortemente positivos de *Candida* sp.

Diferentes estudos realizados anteriormente demonstraram que cepas de *Candida albicans* são excelentes produtoras das enzimas proteínase e fosfolipase, quando apresentaram forte atividade dessas enzimas, 68,8% e 32,3% respectivamente, porém, cepas de outras espécies do gênero *Candida* não foram produtoras destas mesmas enzimas (SILVA et al., 2007; CAMARGO et al., 2008). Todavia, em nosso estudo todas as amostras de *C. krusei* e *C. glabrata* analisadas foram produtoras de fosfolipase e proteínase.

Nos resultados de Oliveira et al (2013), as produções das enzimas foram positivas tanto para a espécie *C. albicans* quanto para outras espécies do gênero *Candida*, como *C. glabrata*, que entre 15 amostras, 1 foi positiva para produção de fosfolipase e 3 para produção de proteínase. Gualberto et al (2013) realizou o teste enzimático em uma única amostra de *C. glabrata* isolada da cavidade oral, obtendo resultado positivo para os dois substratos testados. As cepas de *C. krusei* não foram produtoras das enzimas em nenhum dos estudos citados.

As cepas produtoras de proteínase e fosfolipase são um importante fator de virulência, sendo secretadas tanto pelas espécies não *albicans* das leveduras, como por *C. albicans*. Rorig, et al (2009), afirma que os isolados de *C. albicans* produziram mais proteínase e fosfolipase que as demais espécies. Em outro estudo tem demonstrado a relação entre o aumento na síntese e a atividade das enzimas extracelulares fosfolipasas e proteínases, com a elevação do potencial patogênico das leveduras, levando a quadros clínicos de candidíases mais graves (GIOLO & SVIDZINSKI, 2010).

Candida krusei foi uma das espécies que não foi produtora de enzimas extracelulares fosfolipase e proteínase nos trabalhos supracitados. Não há relatos que *Candida krusei* seja produtora dessas enzimas em outros trabalhos científicos, todavia, no presente estudo *C. krusei* foi produtora tanto de fosfolipase quanto de proteínase. Esse fato pode estar relacionado a fatores como, a grande biodiversidade das espécies de fungos da floresta amazônica, o que favorece a variabilidade genética entre as espécies; ao clima tropical da região norte do Brasil, ambiente favorável para o crescimento desses micro-organismos em diferentes substratos.

4. Conclusão

A frequência de *Candida* sp. representou mais da metade dos isolados clínicos. Variando entre cepas de *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e outras espécies. Amostras contendo uma única espécie demonstraram maior prevalência de *C. albicans* do que outras espécies do gênero.

O teste de susceptibilidade ao extrato de *Psidium guajava* Linn. (goiabeira), demonstrou eficácia sobre todas as cepas do gênero *Candida* analisados na pesquisa, apresentando potencial antifúngico *in vitro*, merecendo um estudo mais aprofundado e possíveis sugestões para usos terapêuticos.

Todas as cepas do gênero *Candida* foram produtoras de enzimas proteínase e fosfolipase, apresentando atividade enzimática positiva e fortemente positiva, observando-se que o fator de virulência do fungo é alto, o que mostra a sua imensa capacidade de se adequar ao organismo humano.

Mais estudos epidemiológicos em pacientes infectados com espécies do gênero



Candida devem ser realizados, focando também em seus históricos clínicos. Pesquisas sobre os mecanismos envolvidos no aparecimento da resistência também são essenciais para o desenvolvimento de novos tratamentos.

Divulgação

Este artigo é inédito e não está sendo considerado para qualquer outra publicação. O(s) autor(es) e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, a revista *Scientia Amazonia* detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação, deste artigo, por meio eletrônico.

Referências

ALVES, P. M.; LEITE, P. H. A. S.; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, L. F.; PEREIRA, M. S. V.; HIGINO, J. S.; LIMA, E. O. **Atividade antifúngica do extrato de Psidium guajava Linn (goiabeira) sobre leveduras do gênero *Candida* da cavidade oral: uma avaliação in vitro.** Rev. Bras. Farmacogn., João Pessoa, v. 16, n. 2, p. 192-196, abr./jun. 2006.

ALVES, P. M.; QUEIROZ, L. M. G.; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, M. S. V. **Atividade antimicrobiana, antiaderente e antifúngica in vitro de plantas medicinais brasileiras sobre micro-organismos do biofilme dental e cepas do gênero *Candida*.** Rev. Soc. Bras. Med. Trop., Brasília, v. 42, n. 2, p. 222-224, mar./abr. 2009.

ANDREOLA, P.; DEMATHÉ, A.; GALAFASSI, D.; ELSEMANN, E. B.; ELSEMANN, R. B.; GAZZONI, A. F. **Comparative study between extracellular phospholipase and proteinase production in clinically important of the genus *Candida* isolated in oral candidiasis patients.** Rev Odontol UNESP. 2016 July-Aug; 45(4): 219-226.

ANVISA. **Microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde.** Manual, 2004. Acesso em 24/08/2016, disponível em http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_microbiologia_completo.pdf.

MICROBIOLOGIA CLÍNICA PARA O CONTROLE DE INFECÇÃO RELACIONADA À ASSISTÊNCIA À SAÚDE. **Módulo 8: Detecção e identificação de fungos de importância médica** /Agência

Nacional de Vigilância Sanitária.– Brasília: Anvisa, 2013. Acesso em 24/08/2016, disponível em [file:///C:/Users/Gestao/Downloads/iras_moduloDe_teccaoFungos%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Gestao/Downloads/iras_moduloDe_teccaoFungos%20(1).pdf).

BARBEDO, L. S.; SGARBI, D. B. G. **Candidíase.** DST - J bras Doenças Sex Transm 2010; 22(1): 22-38.

BRANCO, P. V. G. C.; ANJOS, D. C. V. D.; NASCIMENTO, F. B. D.; VALE, I. N. F.; PEDROZO, C. M. S. A.; MONTEIRO, S. G.; FIGUEIREDO, P. M. S.; MONTEIRO, C. M. **Prevalência e produção de exoenzimas por espécies de *Candida* provenientes da mucosa bucal de pacientes com aids e indivíduos hígidos.** Revista de patologia tropical. vol. 41 (4): 427-441. out.-dez. 2012.

CAMARGO, F. P.; ALVES, I. A.; PARLOW, M. S.; GOULART, S. L. **Isolamento de *Candida* sp. da mucosa vaginal de mulheres atendidas em um serviço de ginecologia do município de Santo Ângelo – RS.** Newslab; 15: 96-104, 2008.

CANABARRO, A.; MARQUES, D. V. G.; COELHO, J. C.; LAZERA, M.; WANKE, B. **Yeasts in chronic periodontitis: literature review.** Rev. Clín. Pesq. Odontol., Curitiba, v. 5, n. 2, p. 135-139, maio/ago. 2009.

CAVALCANTI, Y. W.; PÉREZ, A. L. A. L.; XAVIER, G. D. R.; ALMEIDA, L. F. D.; PADILHA, W. W. N. **Atividade Antifúngica de Extratos Vegetais Brasileiros sobre Cepas de *Candida*.** R bras ci Saúde 16(1):43-48, 2012.

CAVALCANTI, Y. W.; ALMEIDA, L. F. D.; PADILHA, W. W. N. **Screening da atividade antifúngica de óleos essenciais.** Odontol. Clín.-Cient., Recife, 10 (3) 243-246, jul./set., 2011. www.cro-pe.org.br.

FONSECA, J. F.; BOTELHO, A. C. F. **Atividade Antifúngica do Extrato de Folhas de Psidium guajava sobre Leveduras do Gênero *Candida*.** Rev. Fac. Odontol. Porto Alegre, v. 51, n. 1, p. 24-26, jan./abr., 2010.

FREIRE, J. C. P. F.; NÓBREGA, M. T. C.; JÚNIOR, J. K. O.; FREIRE, S. C. P.; RIBEIRO, E. D.; LIMA, E. O. **Atividade antifúngica de fitoterápicos sobre espécies de *Candida*: uma revisão de literatura.** Arch Health Invest 5(6) 2016.



GUALBERTO, R.; PASSOS, S. A.; MATSUURA, A. J. **Determinação da atividade enzimática extracelular de isolados de *Candida* da cavidade oral de pessoas residentes em Manaus/AM.** Instituto de Pesquisa Leonidas e Maria Deane – Fiocruz/AM, 2013.

GIOLO, M. P.; SVIDZINSKI, T. I. E. **Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia.** J Bras Patol Med Lab, v. 46, n. 3, p. 225-234, 2010.

MENEZES, T. O. A.; ALVES, A. C. B. A.; MENDONÇA, L. C. V.; ALVES, B. P.; MENEZES, S. A. F.; VIEIRA, J. M. S. **Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos de plantas da região amazônica sobre cepa de *Candida albicans*.** Rev. odontol. UNESP (Online);38(3), maio-jun. 2009. tab.

OLIVEIRA, S. K. R.; ANJOS, D. C. V.; GONÇALVES, L. H. B.; FERRO, T. A. F.; MONTEIRO, S. G.; FIGUEIREDO, P. M. S.; MONTEIRO, C. M. **Prevalência e produção de enzimas por *Candida* isolados de amostras de secreção vaginal.** Rev Patol Trop Vol. 42 (2): 161-176. Abr.-jun. 2013.

RORIG, K. C. O.; COLACITE, J.; ABEGG, M. A. **Produção de fatores de virulência *in vitro* por espécies patogênicas do gênero *Candida*.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. Abril de 2009.

SILVA, J. O.; FERREIRA, J. C.; CANDIDO, R. C. **Atividade enzimática, produção de slime e sensibilidade a antifúngicos de *Candida sp.*** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 40(3):354-355, mai-jun, 2007.

TÔRRES, A. R.; OLIVEIRA, R. A. G.; DINIZ, M. F. F. M.; ARAÚJO, E. C. **Estudo sobre o uso de plantas medicinais em crianças hospitalizadas da cidade de João Pessoa: riscos e benefícios.** Rev Bras Farmacogn 15: 373-380. 2005.

VENDRUSCOLO, G. S.; RATES, S. M. K.; MENTZ, L. A. **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. 2005.