

MARIA FLAVIANA BEZERRA MORAIS BRAGA

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE
EXTRATOS DE *Psidium guajava* L. (GOIABEIRA) E *Psidium brownianum* MART. EX
DC. (ARAÇÁ DE VEADO) SOBRE ESPÉCIES DE *Candida***

CRATO

2016

MARIA FLAVIANA BEZERRA MORAIS BRAGA

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE
EXTRATOS DE *Psidium guajava* L. (GOIABEIRA) E *Psidium brownianum* MART. EX
DC. (ARAÇÁ DE VEADO) SOBRE ESPÉCIES DE *Candida***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Etnobiologia e Conservação da Natureza da Universidade Federal Rural de Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora.

Orientador: Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho
Universidade Regional do Cariri – URCA.

Co-Orientador: Prof. Dr. Felipe Silva Ferreira
Universidade Federal do vale do São Francisco – UNIVASF.

CRATO

2016

Maria Flaviana Bezerra Morais Braga

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE
EXTRATOS DE *Psidium guajava* L. (GOIABEIRA) E *Psidium brownianum* MART. EX
DC. (ARAÇÁ DE VEADO) SOBRE ESPÉCIES DE *Candida***

Tese defendida em 26 de fevereiro de 2016 e aprovada pela Comissão Julgadora para
obtenção do título de Doutora em Etnobiologia e Conservação da Natureza.

Orientador: _____

Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho, Universidade Regional do Cariri

Co-Orientador: _____

Dr. Felipe Silva Ferreira, Universidade Federal do Vale do São Francisco

Examinadores: _____

Dr. Humberto Medeiros Barreto, Universidade Federal do Piauí - Membro Externo

Dr. Rogério de Aquino Saraiva, Universidade Federal Rural de Pernambuco - Membro
Externo

Dra. Marta Regina Kerntopf, Universidade Regional do Cariri - Membro Interno

Dr. Waltécio de Oliveira Almeida, Universidade Regional do Cariri - Membro Interno

Suplentes: _____

Dra. Roseli Barbosa, Universidade Regional do Cariri

Dra. Fabíola Fernandes Galvão Rodrigues, Faculdade Leão Sampaio

Dedico este trabalho a todos aqueles que partilharam comigo o chão da sala de aula, assim como também à minha filha Mariana Morais Braga, jovem aprendiz, para que saibam que através do estudo é possível mudar contextos e dar sentido à vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser minha âncora e minha luz no caminho que escolhi.

Aos meus amados pais Francisco Ivo Moraes e Maria Socorro Bezerra Moraes, meus conselheiros amigos, mestres, razão da minha vida.

Ao meu irmão José Flávio Bezerra Moraes por sempre acreditar e valorizar meu potencial.

Ao meu esposo Francisco Valdemiro Braga por ter me dado apoio e me auxiliado, dividindo tarefas e responsabilidades familiares e compreendendo que na nossa missão acadêmica algumas ausências se fazem necessárias.

À minha filha Mariana Moraes Braga, por todo amor, por ser a pessoa maravilhosa que é e por tentar entender o que faço e por que o faço, mesmo que no seu mundo infantil a palavra “doutorado” tenha significado diferente do convencional.

À minha amiga e mãe de coração de Mariana, Maria Helena dos Santos Cordeiro, pela dedicação integral à nossa família. Sem ela teria sido muito difícil alçar novos voos na vida acadêmica.

Ao meu Orientador, o Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho por todos os ensinamentos, pelo apoio constante, pela amizade e por tantas oportunidades concedidas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Etnobiologia e Conservação da Natureza.

Aos Professores Dr. Ângelo Giuseppe Chaves Alves, Dra. Elcida Lima Araújo, Dr. Felipe Silva Ferreira, Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho, Dr. Joabe Gomes de Melo, Dr. Marcelo Alves Ramos, Dr. Nicola Schiel, Dr. Severino Mendes de A. Júnior, Dr. Ulysses Albuquerque Paulino e Dr. Waltécio de Oliveira Almeida pelos preciosos conhecimentos compartilhados.

Aos membros da banca da qualificação, Dra. Fabíola Fernandes Galvão Rodrigues, Dr. José Galberto Martins da Costa e Dra. Marta Regina Kerntopf pelas relevantes contribuições para a melhoria do trabalho.

À Universidade Regional do Cariri, casa na qual consolidei minha formação acadêmica desde a Graduação e onde realizo minhas atividades de docência e pesquisa.

Ao Dr. Irwin Rose de Alencar Menezes pelas análises estatísticas e contribuições na apresentação dos resultados.

Ao Dr. José Galberto Martins da Costa por possibilitar a preparação dos extratos, as prospecções químicas e auxiliar na interpretação dos resultados das análises químicas em geral.

Às Dra. Margareth Linde Athayde (*In memoriam*) e Dra. Aline Augusti Boligon da Universidade Federal de Santa Maria por sua relevante parceria nas análises químicas por HPLC.

Ao Herbário Caririense Dárdano de Andrade Lima e à Dra. Carolyn Proença pela identificação das plantas.

Aos anjos acolhedores em Recife: Samara Alves Brito, Jamilly Lopes de Macedo e Gestrudes Nunes de Melo.

À minha amiga e colega de Doutorado Débora Lima Sales pela amizade, companheirismo, partilhas e auxílio nos trabalhos. Afirmo que ela foi parceira ímpar de momentos memoráveis nesta nossa jornada acadêmica de Pós-Graduação (dos cafezinhos, brincadeiras e conversas à noites e noites de estudo, dias e dias de testes, ansiedade e exaustão). Amiga de todas as horas!

A meus alunos de Iniciação Científica Antonia Thassya Lucas dos Santos, Antonio Judson Targino Machado e Joara Pereira Carneiro pelo auxílio, amizade, dedicação e zelo extremamente valiosos, na execução do projeto. Cada um contribuindo à sua maneira, com suas particularidades. Sem eles meu caminhar teria sido lento, solitário e pesado.

Aos meus amigos do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, companheiros, cuja amizade e carinho impulsionam meu caminhar, me fazendo feliz com suas brincadeiras, mas também sempre chegando junto quando preciso: Ana Raquel Pereira da Silva, Antonia Thassya Lucas dos Santos, Antonio Judson Targino Machado, Celestina Elba Sobral Souza, Fábila Ferreira Campina, Gioconda Moraes de A. B. Martins, Jacqueline Cosmo Andrade, Maria Audilene Freitas, Maria do Socorro Costa, Rafael Pereira da Cruz, Raimundo Luiz Silva Pereira, Saulo Relison Tintino e Thiago Sampaio de Freitas.

Aos Integrantes do Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais da URCA pelo auxílio e acompanhamento na realização de ensaios químicos.

Às minhas amigas Antonia Edna Belém, Antonia Eliene Duarte, Magda Alencar Milfont e Yedda Maria Lobo S. de Matos pelo incentivo, afeto e compreensão quanto a ausências, silêncios e distanciamentos durante estes períodos de desdobramento entre trabalho, formação acadêmica e assistência à família.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a concretização dos meus objetivos.

“Que força é esta, eu não sei; tudo o que sei é que existe, e está disponível apenas quando alguém está num estado em que sabe exatamente o que quer, e está totalmente determinado a não desistir até conseguir.”

Alexander Graham Bell

SUMÁRIO

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	x
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE TABELAS	xv
LISTA DE ANEXOS	xvi
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xviii
1 INTRODUÇÃO GERAL	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1 ABORDAGENS PARA DIRECIONAMENTO DE PESQUISAS FARMACOLÓGICAS	24
2.2 ESTUDOS QUÍMICOS E SUA IMPORTÂNCIA	25
2.3 DISTRIBUIÇÃO, MORFOLOGIA E ETNOBIOLOGIA DE ESPÉCIES DE <i>Psidium</i>	26
2.3.1 Gênero <i>Psidium</i>	26
2.3.2 Espécie <i>Psidium guajava</i> L.	27
2.3.2 Espécie <i>Psidium brownianum</i> Mart ex DC	30
2.4 LEVEDURAS DO GÊNERO <i>Candida</i> DE INTERESSE CLÍNICO	31
2.4.1 Gênero <i>Candida</i>	31
2.4.2 Espécie <i>Candida albicans</i>	32
2.4.3 Espécie <i>Candida tropicalis</i>	35
2.4.4. Resistência de espécies de <i>Candida</i> a drogas antifúngicas	36
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
4 ARTIGO 1: <i>Psidium guajava</i> L, DA ETNOBIOLOGIA À VALIDAÇÃO CIENTÍFICA: EFEITO SOBRE MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS	48
5 ARTIGO 2: PHENOLIC COMPOSITION AND MEDICINAL USAGE OF <i>Psidium guajava</i> L.: ANTIFUNGAL ACTIVITY OR INHIBITION OF VIRULENCE?	91
6 ARTIGO 3: HPLC-DAD, FUNGISTATIC AND ANTI-MORPHOGENICAL ANALYSIS OF EXTRACTS FROM <i>Psidium brownianum</i> MART. EX DC. AGAINST YEASTS OF THE GENUS <i>Candida</i>	116
7 ARTIGO 4: <i>Psidium guajava</i> L. E <i>Psidium brownianum</i> MART EX DC.:	

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E EFEITO ANTI - <i>CANDIDA</i> EM ASSOCIAÇÃO COM FLUCONAZOL	138
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	159
ANEXOS	161

LISTA DE SIMBOLOS E ABREVIATURAS

>	Maior que
%	Porcentagem
®	Marca registrada
°C	Grau Celsius
mg/MI	Miligramas de soluto por mililitro de solvente
R	Linearidade da curva
Y	Variável dependente
X	Variável independente
Als	Sequência aglutinina-like - <i>Agglutinin-like sequence</i>
ASD	Ágar Sabouraud Dextrose
C18	Carbono 18 – coluna cromatográfica
CA	<i>Candida albicans</i>
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CTG	Códon formado pelas bases nitrogenadas Citosina, Timina e Guanina
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
cm ²	Centímetro quadrado
CSD	Caldo Sabouraud Dextrose
CSH1	Hidrofobicidade da superfície celular - <i>Cell Surface Hydrophobicity</i>
CT	<i>Candida tropicalis</i>
DAD	Detector de diodos - <i>Diode-Array Detection</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico - <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DP	Desvio padrão
EAP1	Aumento da adesão à proteína de poliestireno 1 - <i>Enhanced adherence to polystyrene protein 1</i>
EAPBD	Extrato Aquoso de <i>P. brownianum</i> por Decocção
EAPBI	Extrato Aquoso de <i>P. brownianum</i> por Infusão
EAPGD	Extrato Aquoso de <i>P. guajava</i> por Decocção
EAPGI	Extrato Aquoso de <i>P. guajava</i> por Infusão
EHPB	Extrato Hidroetanólico de <i>P. brownianum</i>

EHPG	Extrato Hidroetanólico de <i>P. guajava</i>
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
et al	Do latin et alii - e outros; e colaboradores
EUA	Estados Unidos da América
FeCl ₃	Cloreto férrico
G	Grama(s)
EAG/g	Equivalente de ácido gálico por grama
HCDAL	Herbário Caririense Dardano de Andrade Lima
HCl	Ácido clorídrico
HWP1	Hyphal Wall Protein
IC ₅₀	Concentração capaz de inibir 50% das células
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
LM	Laboratório de Micologia
LMBM	Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular
LOD	Limite de Detecção
LOQ	Limite de Quantificação
M	Metro
mg/g	Miligramas por grama
Min	Minuto (s)
ml	Mililitro (s)
Mm	Milímetro (s)
MO	Missouri
MP65	Manoproteína de 65 kDa - <i>Mannoprotein of 65 kDa</i>
NaCl	Cloreto de Sódio
NH ₄ OH	Hidróxido de amônio
Nm	Nanômetro (s)
O	Oeste
PDA	Agar Dextrose de Batata - <i>Potato Dextrose Agar</i>
Ph	Potencial hidrogeniônico
PRA1	pH Antígeno Regulado - <i>pH Regulated Antigen</i>
RBT1	Reprimida por Tup1 - <i>Repressed by Tup1</i>
RNA	Ribonucleic acid

RPM	Rotações por minuto
S	Sul
tR	Tempo de retenção
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
UNB	Universidade de Brasília
URCA	Universidade Regional do Cariri
V	Volume
A	Alfa
B	Beta
µg/mL	Microgramas de soluto por mililitro de solvente
µL	Microlitro (s)
µm	Micrômetro
µM	Micromol
σ/S	Desvio padrão da resposta/desvio da curva de calibração

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Aspectos morfológicos de <i>Psidium guajava</i> L. variação pomífera	28
Figura 2 -	Aspectos morfológicos de <i>Psidium brownianum</i> Mart. Ex DC.	30
Figura 3 -	Tipos celulares de <i>Candida</i>	33
Figura 4 -	Mecanismos de patogenicidade em <i>Candida albicans</i>	34
Artigo 1 -	<i>Psidium guajava</i> L., da etnobiologia à validação científica: efeito sobre micro-organismos patogênicos	
Figura 5 -	Resumo gráfico	51
Artigo 2 -	Phenolic composition and medicinal usage of <i>Psidium guajava</i> L.: antifungal activity or inhibition of virulence?	
Figura 6 -	Chromatogram of <i>Psidium guajava</i> extracts. High performance liquid chromatography phenolics and flavonoids profile of <i>Psidium guajava</i>	102
Figura 7 -	Cell viability curve <i>Candida</i> strains under the effect of <i>Psidium guajava</i>	105
Figura 8 -	Controls used in micromorfology	106
Figura 9 -	Effect of <i>Psidium guajava</i> extracts on the morphology of <i>Candida albicans</i>	109
Figura 10 -	Effect of <i>Psidium guajava</i> extracts on the morphology of <i>Candida tropicalis</i>	110
Artigo 3 -	HPLC-DAD, fungistatic and anti-morphogenical analysis of extracts from <i>Psidium brownianum</i> Mart. Ex DC. against yeasts of the genus <i>Candida</i>	
Figura 11 -	Collection area of <i>Psidium brownianum</i>	121
Figura 12 -	High performance liquid chromatography phenolics and flavonoids profile of <i>Psidium brownianum</i>	126
Figura 13 -	Cell viability curve <i>Candida</i> strains under the effect of <i>Psidium brownianum</i>	129
Figura 14 -	Controls used in Micromorphologic assay of <i>Candida</i> yeast under the effect of the products of <i>Psidium brownianum</i>	130
Figura 15 -	Effect of <i>Psidium brownianum</i> extracts on the morphology of <i>Candida albicans</i>	131
Figura 16 -	Effect of <i>Psidium brownianum</i> extracts on the morphology of <i>Candida</i>	

	<i>tropicalis</i>	132
Artigo 4 -	<i>Psidium guajava</i> L. e <i>Psidium brownianum</i> Mart ex DC.: composição química e efeito anti- <i>Candida</i> em associação com fluconazol.	
Figura 17 -	Comparação da quantidade de compostos fenólicos encontrados em extratos aquosos e hidroetanólicos de <i>Psidium guajava</i> e <i>Psidium brownianum</i>	150
Figura 18 -	Efeito antifúngico do fluconazol sozinho e em combinação com os extratos de <i>Psidium brownianum</i> (MIC/16 µg/mL)	151
Figura 19 -	Efeito antifúngico do fluconazol sozinho e em combinação com os extratos de <i>Psidium guajava</i> (MIC/16 µg/mL)	152

LISTA DE TABELAS

Artigo 1 -	<i>Psidium guajava</i> L., da etnobiologia à validação científica: efeito sobre micro-organismos patogênicos.	
Tabela 1 -	Lista de países onde <i>Psidium guajava</i> é usada como planta medicinal.	72
Tabela 2 -	Uso de <i>Psidium guajava</i> no tratamento de sinais e sintomas relacionados a doenças infecciosas e parasitárias.	74
Tabela 3 -	Validação científica do efeito de <i>Psidium guajava</i> contra micro-organismos patogênicos.	76
Artigo 2 -	Phenolic composition and medicinal usage of <i>Psidium guajava</i> L.: antifungal activity or inhibition of virulence?	
Tabela 3 -	Phenolics and flavonoids composition of <i>Psidium guajava</i> .	103
Tabela 4 -	IC ₅₀ (µg/mL) of <i>Psidium guajava</i> extracts against <i>Candida</i> strains.	104
Artigo 3 -	HPLC-DAD, fungistatic and anti-morphogenical analysis of extracts from <i>Psidium brownianum</i> Mart. Ex DC. against yeasts of the genus <i>Candida</i> .	
Tabela 5 -	Phenolics and flavonoids composition of <i>Psidium brownianum</i> .	127
Tabela 6 -	IC ₅₀ of all products assayed (µg/mL).	128
Artigo 4 -	<i>Psidium guajava</i> L. e <i>Psidium brownianum</i> Mart ex DC.: composição química e efeito anti- <i>Candida</i> em associação com fluconazol.	
Tabela 7 -	Prospecção fitoquímica dos extratos de <i>Psidium guajava</i> e <i>Psidium brownianum</i> .	148
Tabela 8 -	Quantificação de fenóis totais nos extratos de <i>Psidium guajava</i> e <i>Psidium brownianum</i> .	148
Tabela 8 -	Compostos fenólicos majoritários de <i>Psidium guajava</i> e <i>Psidium brownianum</i> (HPLC-DAD).	149
Tabela 9 -	CI ₅₀ dos extratos de <i>Psidium guajava</i> e <i>Psidium brownianum</i> frente a linhagens de <i>Candida</i> (µg/mL).	149
Tabela 10 -	Compostos fenólicos com atividade contra <i>Candida</i> spp.	154

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A –	Comprovante de aceite para publicação no periódico Saudi Journal of Biological Science.	164
ANEXO B –	Comprovante de publicação no periódico International Journal of Food Properties.	163
ANEXO C –	Comprovante de submissão ao periódico Microbial Pathogenesis	164
ANEXO D –	Comprovante de submissão ao periódico Journal of Ethnopharmacology	165
ANEXO E –	Autorização para uso de imagem (Figura 3. Tipos celulares de <i>Candida</i>)	166
ANEXO F –	Autorização para uso de imagem (Figura 4. Mecanismos de patogenicidade em <i>Candida albicans</i>)	167

Braga, Maria Flaviana Bezerra Morais. Dr^a. Universidade Federal Rural de Pernambuco. 02/2016. COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS DE *Psidium guajava* L. (GOIABEIRA) E *Psidium brownianum* MART. EX DC. (ARAÇÁ DE VEADO) SOBRE ESPÉCIES DE *Candida*. Henrique Douglas Melo Coutinho; Felipe Silva Ferreira.

Resumo

Fungos do gênero *Candida* spp. possuem diferentes mecanismos de patogenicidade e resistência, que favorecem seu sucesso adaptativo e o surgimento de infecções invasivas em humanos. Na busca por novos agentes terapêuticos, extratos hidroetanólicos e aquosos das folhas das espécies *Psidium guajava* e *P. brownianum* foram investigados quanto ao potencial antifúngico e composição química. A prospecção química e a quantificação do teor de fenóis totais foram realizadas. A composição fenólica foi investigada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD). Os extratos foram testados frente a linhagens fúngicas de *Candida albicans* e *C. tropicalis* pelo método de diluição em caldo. Foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) com leitura em espectrofotômetro (ELISA). Os dados obtidos foram usados para cálculo da CI₅₀ e montagem da curva de viabilidade celular. A Concentração Fungicida Mínima (CFM) foi determinada por subcultivo. Os extratos (CIM/16) foram associados ao fluconazol para verificação de efeito potencializador. O efeito sobre o dimorfismo de *Candida* spp. foi avaliado em câmaras de microcultivo. A presença de flavonoides, fenóis e taninos foi constada e os teores de fenóis variaram de 49,25-80,77 a 68,06-82,18 EAG/g para *P. brownianum* e *P. guajava*, respectivamente. Os compostos majoritários dos extratos na análise foram, no geral, quercetina e luteolina. Os extratos apresentaram efeito fungistático (CIM 8.192 µg/mL) e a combinação dos extratos com fluconazol demonstrou efeito sinérgico. Todos os extratos afetaram a transição morfológica de *C. albicans* e *C. tropicalis* em concentrações crescentes. Embora sejam produtos naturais de plantas diferentes, a composição química semelhante e os efeitos biológicos demonstrados indicam que as espécies do gênero *Psidium* são efetivas no combate a virulência de fungos de *Candida* spp., sem eliminar essas populações.

Palavras-chave: *Psidium*. Leveduras. Fungistático. Anti-dimorfismo. Sinergismo.

Braga, Maria Flaviana Bezerra Morais. Dr^a. Universidade Federal Rural de Pernambuco. 02/2016. CHEMICAL COMPOSITION AND EVALUATION OF THE ANTIFUNGAL ACTIVITY OF EXTRACTS FROM *Psidium guajava* L. (GOIABEIRA) AND *Psidium brownianum* MART. EX DC. (ARAÇÁ DE VEADO) AGAINST *Candida* SPECIES. Henrique Douglas Melo Coutinho; Felipe Silva Ferreira.

Abstract

The fungi of the genus *Candida* spp. present different mechanisms of pathogenicity and resistance, which favor their adaptive success and the onset of invasive infections in humans. In the search for new therapeutic agents, the hydroethanolic and aqueous extracts from the leaves of the *Psidium guajava* e *P. brownianum* species were investigated for the antifungal potential and the chemical composition. The chemical prospection and the quantification of total phenols were performed. The phenolic composition was investigated by high-performance liquid chromatography (HPLC-DAD). The extracts were tested against the *Candida albicans* and *C. tropicalis* fungal strains by the broth dilution method. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined using a spectrophotometer (ELISA). The data were used to calculate the IC₅₀ and construct the cell viability curve. The minimum fungicidal concentration (MFC) was determined by subculturing. The extracts (MIC/16) were associated with fluconazole to investigate the potentiating effect. The effect on the *Candida* spp dimorphism was evaluated in microcultiive cameras. The presence of flavonoids, phenols and tannins were determined and phenol concentrations ranged from 49.25-80.77 to 68.06-82.18 EAG/g in *P. brownianum* and *P. guajava*, respectively. The major compounds detected in the analysis were quercetin and luteolin. The extracts presented an antifungal effect (CIM 8.192 µg/mL) and the combination of these extracts with fluconazole caused a synergistic effect. All extracts, at increasing concentrations affected the morphological transition of *C. albicans* and *C. tropicalis*. Although these natural products belong to different plants, the similar chemical composition and biological effects demonstrated here indicate that the species from the genus *Psidium* are effective in the fight against the virulence of the *Candida* spp. fungi, without however, eliminating these fungal populations.

Keywords: *Psidium*, Yeasts. Fungistatic. Anti-dimorphism. Synergism.

INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO GERAL

A resistência dos micro-organismos a agentes terapêuticos usados na atualidade tem causado impacto econômico e social. A resistência fúngica tem sido de certa forma negligenciada quando se compara à grande repercussão que tem a resistência bacteriana (DELARZE e SANGLARD, 2015). Uma está estritamente relacionada à outra, uma vez que o uso intensivo da antibioticoterapia antibacteriana reduz a competitividade na biota humana e favorece o crescimento de leveduras de *Candida* spp. que oportunamente passam de comensais a patógenos (SHANKAR, et al., 2015). Além disso, outros fatores contribuem para o aumento da resistência, tais como a expressiva elevação do número de pacientes imunodeprimidos e o uso prolongado de dispositivos cirúrgicos, considerados *drives* de resistência (DELARZE e SANGLARD, 2015; PERLIN et al., 2015).

As infecções causadas por *Candida* spp. têm apresentado elevado nível de incidência, onde *Candida albicans* e *Candida tropicalis* se destacam, com notoriedade para a primeira, como agentes capazes de causarem infecções invasivas (DEORUKHKAR; SAINI; MATHEW, 2014). Seus fatores de virulência propiciam adaptabilidade, uma vez que permitem o cumprimento de critérios importantes à sobrevivência, tais como possuir tolerância a altas temperaturas e potencial invasor, promover lise e absorção de tecidos humanos e resistir às defesas imunológicas (KÖHLER; CASADEVALL; PERFECT, 2015).

O contexto atual exige buscas por substâncias bioativas que apresentem potencial antifúngico. Novos agentes terapêuticos podem estar contidos em plantas e conseqüentemente, seus extratos e óleos essenciais podem servir como subsídios para estudos aprofundados e pesquisas que contemplem e objetivem a formulação de novos medicamentos (SARDI et al., 2013).

A combinação de compostos multidroga tem sido cada vez mais comum, uma vez que aspectos econômicos estão em jogo. Assim, novas formulações farmacêuticas mais potentes são testadas a partir de duas ou mais drogas pré-existentes (CHEN et al., 2014; SPITZER et al., 2011). Pesquisas têm sido realizadas no sentido de promover a combinação de fármacos comerciais, para os quais já tenha sido verificado o fenômeno da resistência, com produtos naturais na forma de extrato, frações, óleos essenciais ou constituintes isolados, numa tentativa de driblar a resistência de *Candida* spp. (CALIXTO JÚNIOR et al., 2015; REKHA e VIDYASAGAR, 2013; SINGH et al., 2013).

Atividades biológicas de plantas podem ser indicadas como probabilidades através do uso etnobiológico em práticas medicinais populares ou através da filogenética, tendo como base a semelhança química entre as espécies e o registro de bioatividade exibido para plantas aparentadas, entre outras abordagens (ALBUQUERQUE e HANAZAKI, 2006; SASLIS-LAGOUDAKIS, et al., 2011).

Relatos etnobotânicos têm contribuído para descobertas importantes no cenário farmacológico (ARAÚJO; MELO; ALBUQUERQUE, 2014; JUÁREZ-VÁZQUEZ et al., 2013; MACÊDO et al., 2015). Em diversas localidades plantas são utilizadas para o tratamento de infecções causadas por fungos, a partir da utilização de folhas, raízes e demais órgãos (FENNER et al., 2006; LIU, et al., 2012) por meio de diferentes preparações terapêuticas feitas utilizando uma ou um conjunto de plantas, cujo potencial medicinal lhe foi creditado ao longo de gerações (MATOS, 2009).

A composição química de espécies medicinais lhes agrega valor farmacológico e por conta disso, espécies do mesmo gênero são pesquisadas na busca de atividades biológicas, imputadas à ação de seus metabólitos secundários. Neste sentido, o conhecimento da composição química de uma espécie é fundamental para a elucidação de seus atributos terapêuticos e, sobretudo, seu mecanismo de ação (ARAÚJO; MELO; ALBUQUERQUE, 2014; MATOS, 2009; WINK, 2015).

Em um contexto de diversidade vegetal, espécies do gênero *Psidium* figuram nos mais variados ambientes nas regiões neotropicais através de cultivo, contribuindo para o bem estar de inúmeras populações humanas tanto para a alimentação, quanto para finalidades terapêuticas (COSTA, 2009; FRANZON et al., 2009). O gênero *Psidium* possui uma série de atividades biológicas comprovadas através de ensaios *in vitro* e *in vivo*, entre as quais, o efeito antifúngico (CAMACHO-HERNÁNDEZ et al., 2004; LAPENNA et al., 2003; SUWANMANEE; KITISIN; LUPLERTLOP et al., 2014; WEN et al., 2011).

Dentre as espécies do gênero, *Psidium guajava* L. e *Psidium brownianum*, Mart ex DC. possuem valor etnomedicinal, onde a primeira é conhecida por sua versatilidade terapêutica, sendo utilizada entre outras coisas para o tratamento de sintomas associados às infecções causadas por *Candida* spp. (MORAIS-BRAGA et al., 2015) e a segunda, usada para a tratar sintomatologia ocasionadas pelo processo de infecção viral atribuída ao vírus da gripe (JESUS, 2012).

O objetivo desse estudo foi investigar a composição química e o efeito antifúngico (*in vitro*) de extratos aquosos e hidroetanólico, nas formas de uso tradicional (infusão, decocção e

tintura), obtidos de *P. guajava pomifera* (goiaba vermelha) e *P. brownianum* Mart. ex DC. (araçá de veado ou goiabinha) sobre cepas de *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. Para tanto, inicialmente as plantas foram selecionadas utilizando-se duas distintas abordagens: a etnodirigida (*P. guajava*) e a quimiotaxonômica (*P. brownianum*).

Os resultados da pesquisa estão apresentados em capítulos disponibilizados após a revisão de literatura. O capítulo inicial traz um artigo de revisão sobre a etnobiologia e a validação científica das atividades antimicrobianas da espécie *Psidium guajava*. Nesta revisão não foi incluída a espécie *P. brownianum*, uma vez que informações etnofarmacológicas sobre a espécie são escassas. Na sequência, são apresentados dois artigos abordando a composição química e a atividade anti-*Candida* de cada uma das plantas, separadamente, preparadas conforme uso medicinal popular e ensaiadas para verificação do tipo de efeito (fungistático ou fungicida) exercido sobre *Candida* spp. e sobre o dimorfismo celular, um fator de virulência de leveduras. Por último, em um quarto artigo, é abordado o efeito potencializador do antifúngico fluconazol pelos extratos das espécies, além de serem acrescentadas informações químicas e uma comparação da composição fenólica dos extratos de *P. guajava* e *P. brownianum*.

Todas as informações obtidas para a espécie *P. brownianum* são de natureza inédita, uma vez que esta, endêmica do Brasil, não apresenta relatos bibliográficos de atividades biológicas nem de composição química. Para a espécie *P. guajava*, o ineditismo fica por conta da abordagem que é dada em relação ao efeito potencializador da ação de antifúngico e sobre inibição da transição morfológica de *Candida* spp., além da padronização das preparações medicinais, baseadas no conhecimento popular para obtenção de tais efeitos.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ABORDAGENS PARA DIRECIONAMENTO DE PESQUISAS FARMACOLÓGICAS

As pesquisas farmacológicas ao longo dos anos tem sido realizadas utilizando-se diferentes tipos de abordagens, a maioria pautada em algum tipo de observação (ALBUQUERQUE e KANAZANI, 2006). As abordagens randômica, etológica, biotecnológica, quimiotaxonômica e a etnobiológica são as mais conhecidas.

Muitas vezes a busca por plantas com potencial farmacológico se dá após levantamento florístico de uma determinada região, onde plantas, de forma aleatória, são levadas a investigações quanto à sua constituição química e seus potenciais farmacológicos, em um tipo de abordagem denominada randômica (ALBUQUERQUE e KANAZANI, 2006).

Outra estratégia para encontrar espécies bioativas é a que se baseia em zoofarmacognosia, que é o uso das plantas por animais para tratamento de suas enfermidades. Esta abordagem se baseia na observação das interações ecológicas entre os seres, como por exemplo, animais e plantas (GUIRADO e CUÉLLAR, 2008) e pode ser conhecida também por abordagem etológica (ALBUQUERQUE e HANAZAKI, 2006).

Novas tecnologias favorecem novas metodologias e nesse sentido, outro método direcionador de pesquisas farmacológicas se baseia em ferramentas biotecnológicas. A genômica, proteômica e a metabolômica priorizam o conhecimento bioquímico e molecular das espécies que podem subsidiar as investigações na busca por princípios ativos (GUIRADO e CUÉLLAR, 2008).

A quimiotaxonomia baseia-se no fato de que existem grupos “quentes” de plantas com atividades biológicas, espécies aparentadas que podem exibir potencial medicinal e que há uma relação entre filogenia e distribuição de componentes químicos nas plantas. Diante desse contexto pesquisas farmacológicas têm sido realizadas tendo como base a relação entre a semelhança química e o registro de bioatividade já relatado para famílias e gêneros do qual faz parte a espécie que se deseja investigar (SASLIS-LAGOUDAKIS, et al., 2011).

A utilização de plantas medicinais por diferentes populações, fato que perpassa gerações, tem destacado espécies que apresentam princípios ativos de reconhecida relevância clínica, que em alguns casos foram transformados em medicamentos modernos (GHORBANI; NAGHIBI; MOSADDEGH, 2006). Evidências terapêuticas de sucesso observadas a partir do cotidiano de comunidades tradicionais ou locais têm inspirado

pesquisas farmacológicas, e isto configura a base da abordagem etnobiológica, que se norteia nas práticas e no conhecimento popular, consolidado através do tempo, da cultura e da história de diversos povos, contribuindo para a descoberta de agentes com potenciais terapêuticos ou ainda de um novo fármaco, mais especificamente (ALBUQUERQUE e HANAZAKI, 2006; GHORBANI; NAGHIBI; MOSADDEGH, 2006).

2.2 ESTUDOS QUÍMICOS E SUA IMPORTÂNCIA

A natureza contribui de forma expressiva para produção do que se conhece como substância orgânica e isto pode ser verificado em diferentes grupos de seres. O reino vegetal se destaca por contribuir com parte substancial de metabólitos secundários disponíveis na natureza, o que possibilita, sobretudo, a sobrevivência de espécies e sua adequação a diferentes tipos de ambientes e interações ecológicas. Estas substâncias possuem grande valor agregado devido às suas aplicações como cosméticos, alimentos, agroquímicos e medicamentos (PINTO et al., 2002; SIMÕES et al., 2010).

Em virtude da importância dos metabólitos secundários tanto para a saúde quanto para a alimentação, o estudo sobre a composição química de espécies vem se tornando cada vez mais crescente e aprofundado, sendo que, em um contexto farmacêutico, o principal interesse é essencialmente pelo fato de possuírem notáveis atividades biológicas farmacologicamente aplicáveis (MATOS, 2009; SIMÕES et al., 2010).

A abordagem fitoquímica aplica um conjunto de técnicas de prospecção que possibilita ao pesquisador “um certo grau de familiarização com o material trabalhado”, além de elucidar e catalogar os constituintes químicos oriundos do metabolismo secundário dos seres vivos, por meio do isolamento e deslindamento de sua constituição molecular, agregando conhecimento sobre inúmeros compostos naturais (MATOS, 2009).

Os resultados de uma prospecção química poderão variar para uma mesma espécie caso não seja observada uma padronização nas técnicas do pesquisador. De acordo com Chang et al. (2013), fatores como hora da colheita, forma de coleta e processamento, temperatura, entre outros, podem influenciar, provocando diferenças no perfil químico. O processo de elucidação da composição química das espécies pode ser dificultado devido a diferentes fatores como o seu dinamismo químico, o tipo de clima, solo e até mesmo da luminosidade solar do ambiente no qual está inserida (MATOS, 2009).

Diferentes tipos de metodologias são utilizados para detectar, quantificar e até mesmo isolar compostos contidos em produtos naturais que são analisados na forma de extratos, óleos e frações polares e apolares. A marcha química é um método que favorece a detecção de constituintes químicos micromoleculares em quantidades contempláveis em extratos vegetais, que possui algumas limitações, como por exemplo, a impossibilidade de revelar a presença de protídios, glicídios e outras substâncias macromoleculares (MATOS, 2009).

No campo da análise instrumental, a cromatografia tem sido usada como ferramenta para a realização de procedimentos analíticos qualitativos e quantitativos de compostos complexos (ZHANG et al., 2015). É um método físico-químico de separação utilizado para a detecção de compostos através da comparação com analitos padrões, além de possibilitar o isolamento e purificação de compostos (DEGANI; CASS; VIEIRA, 2011). Esta técnica figura entre as principais quando se trata de separação de compostos, uma vez que permite a análise de substâncias em matrizes complexas, separando componentes contidos nas misturas, graças à eficiência e poder de resolução de suas colunas. Dessa forma, torna-se possível proceder a análise em fluidos biológicos, produtos naturais, sedimentos de rio e outros (LANÇAS, 2009).

Uma das técnicas analíticas mais utilizadas nos últimos 40 anos é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), empregada em laboratórios de análises diversos como os de indústrias química e farmacêuticas, por exemplo (MALDANER e JARDIM, 2009). Nesse tipo de análise cromatográfica, o uso de detectores como Índice de Refração, Ultravioleta, Espalhamento de luz, Fluorescência e outros, associados a softwares específicos, favorecem a realização de análises quantitativas de constituintes de uma mistura em baixíssimas concentrações. Detectores baseados em arranjos (malhas) de diodos (“Photodiode Array”, PDA), aliados a computadores modernos e softwares adequados possibilitaram o armazenamento de dados de uma faixa espectral, geração de espectros tridimensionais e determinação automática da pureza de picos cromatográficos (LANÇAS, 2009).

2.3 DISTRIBUIÇÃO, MORFOLOGIA E ETNOBIOLOGIA DO GÊNERO *Psidium*

2.3.1 Gênero *Psidium*

A família Myrtaceae possui 10 gêneros entre os quais *Psidium* está inserido (GIARETTA e PEIXOTO, 2015) e seus indivíduos apresentam hábito que pode variar entre arbustivo, subarbustivo e arbóreo (SOBRAL et al., 2015).

Nesse gênero estão incluídas aproximadamente 92 espécies de acordo com Govaerts et al. (2008), que possuem distribuição neotropical, podendo ser encontradas do Sul do México à Argentina, na Índia e em arquipélagos do Pacífico (FRANZON et al., 2009), em diferentes ambientes, tais como: área antrópica, Caatinga Campo de Altitude, Campo Limpo, Campo Rupestre, Carrasco, Cerrado, Floresta de Terra Firme, Floresta de Várzea, Floresta Estacional Semidecidual, Floresta Ombrófila (= Floresta Pluvial), Floresta Ombrófila Mista, Restinga, Savana Amazônica (SOBRAL et al., 2015).

As plantas apresentam folhas simples e opostas, glabras, ou com indumento, tricomas simples, flores pentâmeras solitárias, axilares ou em pequenos racemos, dicásio ou botrióides. Os botões maduros variam de 4 mm a 15 mm; o cálice apresenta morfologia variável, oscilando de cupuliforme até caliptrato e, raramente, apendiculado; as pétalas são livres e alternadas, de cor branca ou creme; muitos estames podem ser visualizados (60 até 320) arranjados em 3 a 12 verticilos; possui ovário ínfero, com 2 a 5 lóculos e alguns a muitos óvulos por lóculos, com placentação intrusiva; fruto são bacóides com muitas sementes; sementes com testa óssea e embrião coclear com cotilédones apicais (COSTA, 2009; FRANZON et al., 2009).

Espécies de *Psidium* possuem importância etnobotânica sendo utilizados na alimentação, para consumo tanto *in natura* quanto industrializados, em processos agroindustriais; na medicina local como agente terapêutico, através do aproveitamento de partes como caule, raiz, folhas; na produção de madeira para construção e lenha para aproveitamento doméstico, de artesanatos e pelo fornecimento de sombra (CAMPOS, 2010).

2.3.2 Espécie *Psidium guajava* L.

A espécie *Psidium guajava* L. (Figura 1), comumente conhecida como goiaba, é uma árvore que pode apresentar crescimento até cerca de 35 m de altura (JOSEPH e PRIYA, 2011a). Nativa da América tropical, pode se adaptar a diferentes condições climáticas e ser cultivada em regiões tropicais e subtropicais do mundo, estando disponível a populações locais (GUPTA; CHACAL; ARORA, 2011; GUTIÉRREZ; MITCHELL; SOLIS, 2008; JOSEPH e PRIYA, 2011a).

Possui tronco tortuoso com casca lisa e descamante, folhas simples, oblongo-elípticas a ovaladas e de textura coriácea, de 8-12 cm de comprimento por 3-6 cm de largura, com tricomas simples tanto na nervura central como em toda lâmina da face abaxial (BACCHI;

OKAMOTO; KATO, 2009; DUARTE, PAULA, 2005). Suas flores são brancas, axilares, solitárias ou em grupos de 2-3, possuem botões com cálice cônico e os frutos são bacóides, com polpa doce e aromática nas cores amarela, rosa ou branca e numerosas sementes (CAMPOS, 2010).

Figura 1. Aspectos morfológicos de *Psidium guajava* L. variação *pomífera*



Fonte: Fotos originais

Do gênero à qual pertence, *P. guajava* é uma das plantas com grande valor econômico e medicinal. Seu fruto é muito apreciado e conhecido, com expressiva produção mundial (TZEC et al., 2010) e o consumo é feito *in natura* e novas alternativas são geradas através da industrialização, como o preparo de geleias (ZOTARELLI; ZANATTA; CLEMENTE, 2015), doces (FREDA et al, 2014), barra de cereais (ROBERTO et al., 2015), bolos (SOUSA et al., 2014; UCHOA et al., 2011) e sucos (BATISTA et al., 2010), entre outros produtos.

A espécie possui destaque no uso medicinal tendo suas partes utilizadas para o tratamento de diversas enfermidades, tais como infecções respiratórias, intestinais e urinárias, cólera, diabetes, hipertensão, dores, doenças venéreas, doenças de pele, gastrites, úlceras, micoses, aftas, diarreia, entre tantas outras, sendo preparada na forma de decocção, infusão, tintura, pasta e pó (BARBALHO et al., 2012; BORBA e MACEDO, 2006; GUTIÉRREZ; MITCHELL; SOLIS, 2008; SHRUTHI et al. 2013).

Possui diferentes efeitos farmacológicos comprovados e entre estes podemos citar: atividades antibacteriana (RAJAN et al., 2015), antifúngica (SUWANMANEE; KITISIN; LUPLERTLOP, 2014), antiprotozoária (GACHET et al., 2010), antiviral (SRIWILAIJAROEN et al., 2012), antioxidante (FLORES et al., 2015), antiabética (MAZUMDAR; AKTER; TALUKDER, 2015) e antidiarreica (OJEWOLE; AWE; CHIWORORO, 2008), além de outros potenciais terapêuticos.

No que diz respeito à atividade antifúngica, *P. guajava* tem sido abordada em muitas pesquisas que relatam seu efeito contra leveduras, fungos dermatófitos e filamentosos, nas quais foram avaliados diferentes tipos de extratos e frações por métodos diversificados (CHANU et al., 2011; EGHAREVBA et al., 2010; FERREIRA et al., 2013; FONSECA e BOTELHO, 2011; MAILOA et al., 2014; PADRÓN-MÁRQUEZ et al., 2012; PERERA et al., 2014; SUWANMANEE; KITISIN; LUPLERTLOP, 2014). Como exemplo, podemos citar ensaios frente a linhagens de *Candida* (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. dublinensis*), cujos resultados mostram variações de Concentração Inibitória Mínima (15 a 250 µg/mL) quando foram testados os extratos aquosos, etanólicos e de acetona (FERREIRA et al., 2013) e zonas de inibição que variaram de 10 a 14 mm frente a *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* quando foi testado o potencial do extrato hidroetanólico (FONSECA e BOTELHO, 2011).

A composição química de *P. guajava* já investigada, havendo registros inclusive, de compostos isolados; Thenmozhi e Rajan (2015) detectaram a presença de taninos, saponinas, flavonoides, esteroides, carboidratos, polifenóis e glicosídeos nas folhas da planta. Entretanto, além da constatação de tais metabólitos, outros compostos foram identificados, como por exemplo: ácido 1,2-benzenodicarboxílico, dibut, alfa-bisabolol, ácido 1,2-benzenodicarboxílico, butil, hexadeca-2,6,10,14-tetraen, cariofileno, cloreto de bis (2-etilhexil) ftalato, nerolidol e germacreno. Também possui outros compostos, tais como obtusilino, clovan-2β, 9α-diol, cariolano-1,9β-diol, ácido-3β- (p-oxi-cumaroil) -2α, 23-dihidroxi urs-12-en-28-óico e ácido-3β, 6β, 23 -trihidroxi -urs-12-en-28-óico (BEGUM et al. 2015). Entretanto, mais constituintes foram relatados no trabalho de revisão feito por Barbalho et al. (2012) e Gupta, Chahal e Arora (2011) que relataram fitoconstituintes de várias partes da planta e de Joseph e Priya (2011b) que abordam os compostos encontrados no óleo essencial.

2.3.3 Espécie *Psidium brownianum* Mart ex DC.

A espécie *Psidium brownianum* Mart. Ex DC. (Figura 2), araçá-de-veado, como é localmente denominada na Chapada do Araripe, Brasil, pode ser caracterizada como sendo arbusto ou árvore, atingindo de 0,5 – 8 m (SOBRAL, 2015). É uma planta glabra, com folhas geralmente coriáceas e pecíolo curto, suas flores são brancas e o fruto pode variar entre elíptico e estriado e globoso e possuindo geralmente 12 sementes (GIARETTA e PEIXOTO, 2015; OLIVEIRA, 2013).

Planta nativa e endêmica do Brasil é registrada nas regiões Nordeste (Alagoas, Bahia, Pernambuco) e Sudeste do Brasil (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro), nos domínios fitogeográficos da Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (SOBRAL et al., 2015). Neste trabalho, registramos também a sua ocorrência na Chapada do Araripe em Crato, Ceará.

O uso etnobotânico de *P. brownianum* tem sido verificado em algumas localidades da Bahia, Brasil, onde o fruto é apreciado para alimentação e suas folhas jovens, no caso brotos, são utilizados para o tratamento de gripe (JESUS, 2012).

Figura 2. Aspectos morfológicos de *Psidium brownianum* Mart. Ex DC.



Fonte: Fotos originais

Sendo uma espécie com poucos relatos bibliográficos, ainda não foram registradas informações sobre atividade biológica e constituição química.

2.4 LEVEDURAS DO GÊNERO *CANDIDA* DE INTERESSE CLÍNICO

2.4.1 Gênero *Candida*

Fungos podem assumir diferentes papéis junto à espécie humana. Enquanto comensais associam-se ao hospedeiro sem prejudicá-lo e enquanto parasitos, existem espécies que podem se comportar como parasitos obrigatórios, facultativos ou ocasionais e, dependendo do seu potencial invasor e de virulência, acarretam morbidades que podem variar no que diz respeito à intensidade e gravidade (MORAES; LEITE; GOULART, 2008).

Diversas leveduras comensais, presentes nas superfícies mucocutâneas, podem, diante de fatores extrínsecos e intrínsecos, sofrer um desequilíbrio no seu crescimento populacional e, conseqüentemente invadir e lesionar tecidos vivos, comportando-se como oportunistas (BROWN et al. 2012; SIDRIM e ROCHA, 2010).

Alguns grupos de leveduras podem ser destacados como sendo de relevante interesse clínico, como por exemplo, os gêneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*, *Saccharomyces* e *Blastoschizomyces* (SIDRIM e ROCHA, 2010).

Leveduras do gênero *Candida* spp. são reconhecidas e consideradas por serem as maiores responsáveis por infecções fúngicas nosocomiais (RIBEIRO et al. 2004). Diversas espécies deste gênero, exceto *Candida glabrata* e *Candida krusei*, traduzem o códon CTG como serina ao invés de leucina e são capazes de alternarem tanto a morfologia celular quanto a de suas colônias, fatores que tem forte relação com a sua patogenicidade (BUTLER et al., 2009; MANCERA et al, 2015). *Candida* spp. são taxonomicamente enquadradas no reino *Fungi*, filo *Eumycota*, subfilo *Deuteromycotina*, classe *Blastomycetes*, família *Cryptococcaceae* e compreendendo aproximadamente 200 espécies (SIDRIM e ROCHA, 2010).

Estes fungos possuem morfologia leveduriforme, são unicelulares e reproduzem-se por brotamento, podendo ser encontradas em membranas mucosas de mamíferos, especialmente as do trato gastrointestinal e genitourinário, habitando como comensais, com potencialidade para se tornarem patógenos oportunistas com capacidade provocar infecções superficiais e sistêmicas (KÖHLER; CASADEVALL; PERFECT, 2015; MICELI; DÍAZ; LEE, 2011).

As infecções causadas por espécies de *Candida* geralmente têm acometido pacientes imunocomprometidos, usuários de nutrição parenteral e antibióticos de amplo espectro, de cateteres intravenosos e que se submetem a quimioterapia citotóxica e a transplante de órgãos (ORTEGA et al., 2011).

A espécie *Candida albicans* é responsável por mais de 50% das infecções superficiais e sistêmicas causadas pela ação de leveduras (SILVA-DIAS, 2015), mas o acometimento de infecções por espécies não-*albicans* tem se intensificado. Sidrim e Rocha (2010) registraram que quadros clínicos envolvendo leveduras do gênero *Candida* geralmente revelam a presença de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei*, sendo que, é possível encontrar outras espécies menos comuns, como *Candida lusitanae*, *Candida rugosa*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida guilliermondii*, por exemplo.

As espécies do gênero *Candida* possuem diferentes fatores de virulência e a expressão destes pode variar, pois depende da espécie responsável pela infecção, da origem geográfica e do tipo, local e estágio da infecção (DEORUKHKAR; SAINI; MATHEW, 2014). Os fatores de virulência incluem, desde a formação de tubo germinativo, proteínas do tipo adesinas, biofilme, tigmotropismo, produção de enzimas hidrolíticas e alterações fenotípicas, entre outras particularidades (SARDI et al., 2013).

2.4.2 Espécie *Candida albicans*

Candida albicans é uma espécie comensal de mucosas superficiais, encontrada no trato gastrointestinal, cuja população é controlada no organismo humano por três fatores: flora microbiana normal, barreiras epiteliais e o sistema imunológico (GOW e HUBE, 2012). Possui capacidade adaptativa e, portanto, potencial para se tornar um patógeno oportunista, especialmente em indivíduos com imunidade comprometida (KADOSH e LOPEZ-RIBOT, 2012), implantando-se secundariamente no decurso do diabetes, de traumatismos diversos, gravidez e em indivíduos infectados pelo HIV (ZHANG et al., 2002). *C. albicans* é uma das principais causadoras de infecções fúngicas em humanos, sendo que estas ocorrem em decorrência de alteração imunológica no organismo humano e da virulência da espécie, que apresenta plasticidade morfológica (MONGE et al. 2006).

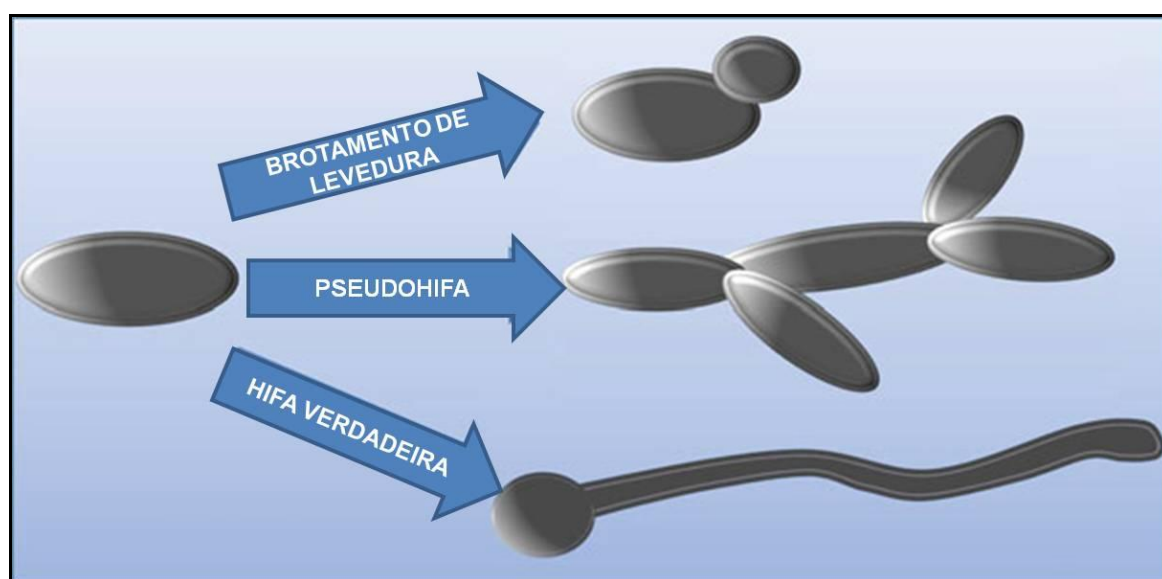
Podem existir três morfologias diferentes para a célula de *C. albicans*: a levedura, a pseudohifa e a hifa. Enquanto as leveduras crescem por brotamento, nas pseudohifas, as células sofrem alongamento, mas não se separam da célula-mãe e mantêm constrições nas

junções septais. Já as hifas se apresentam como células alongadas de aspecto tubular sem, no entanto, possuir constrições nas junções septais (KIM e SUDBERY, 2011).

Uma série de fatores físicos, químicos e biológicos podem influenciar no crescimento e na patogenicidade de *C. albicans*, entre esses, temperatura, atividade de água, gases, metabolitos e concentrações de íons (COTTIER e MÜHLSCHLEGEL, 2009).

A capacidade que a espécie tem de sofrer alteração morfológica passando da forma leveduriforme (dispersiva) para a filamentar (invasiva e capaz de escapar do fagossoma) (Figura 3) é uma das suas características mais notáveis e esta pode ser induzida por sinais ambientais tais como, a presença de soro de mamífero, temperatura corporal, densidade celular, alterações de pH e estado de inanição (KADOSH e LOPEZ-RIBOT, 2013; KIM, SUDBERY, 2011; MAYER; WILSON; HUBE, 2013).

Figura 3. Tipos celulares de *Candida*

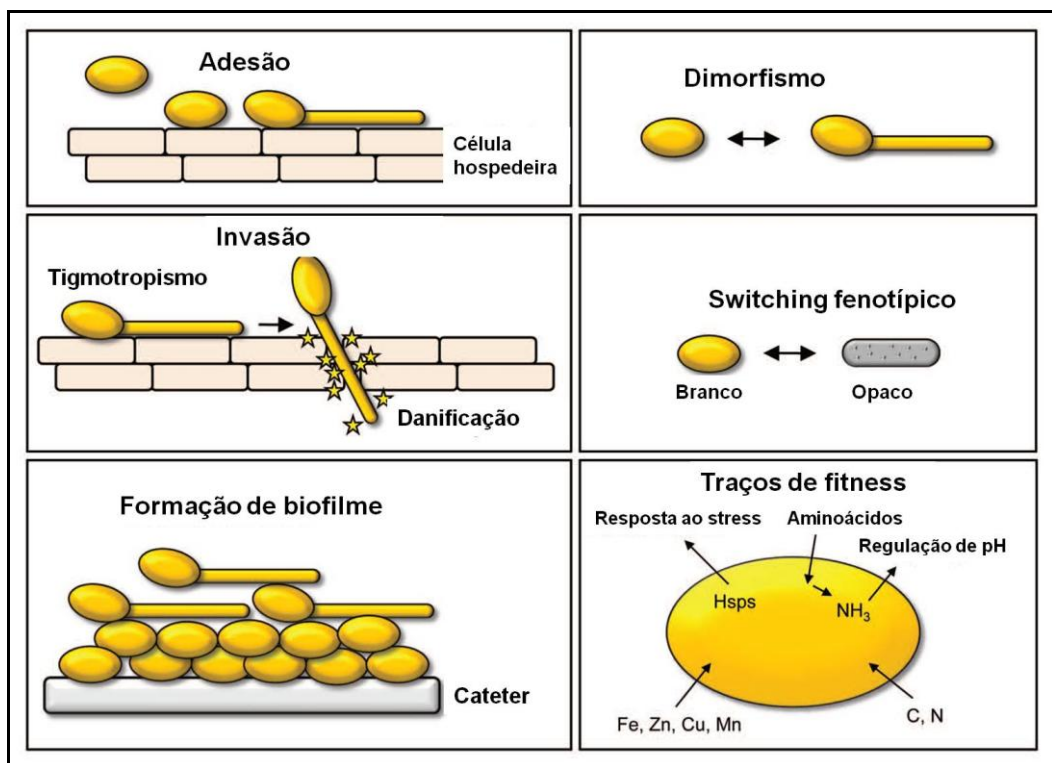


Fonte: O'Donnell; Robertson; Ramage (2015), com permissão.

O estado leveduriforme é favorecido por uma temperatura de 30° C e manutenção de pH ácido (pH 4,0). Hifas e pseudohifas são formadas com a elevação da temperatura para 37° C e 35° C e pH neutro e ácido (pH 5,5) respectivamente, presença de soro, quantidade elevada de CO₂ e presença de N-acetilglucosamina. O processo de formação das hifas é regulado por um mecanismo de *quorum-sensing*, no qual as leveduras produzem pequenas moléculas como, por exemplo, o farnesol que é capaz de inibir a produção das hifas (KIM e SUDBERY, 2011). Entretanto, *C. albicans* possui outros mecanismos de patogenicidade que agem desde o primeiro contato com pele e mucosa até a invasão de tecidos.

Os processos de adesão e invasão de *C. albicans* ocorre quando, inicialmente as leveduras se ligam às superfícies celulares através da expressão de proteínas denominadas adesinas. O contato com a célula favorece o dimorfismo das espécies de *Candida* e um tipo de crescimento direcionado conhecido como tigmotropismo. Nesse ponto, proteínas invasivas são expressas e medeiam um mecanismo de adsorção do fungo por meio de endocitose induzida. A invasão celular ocorre por penetração ativa, através da quebra de barreiras (aderência, força física e secreção de hidrolases). A fixação de leveduras de *C. albicans* em superfícies bióticas (células hospedeiras) e abióticas (cateteres) e a plasticidade fenotípica (*Phenotypic Switching*) desencadeiam a formação de biofilme, um acúmulo organizado de células, onde as formas leveduriformes localizam-se na camada inferior e as hifas se sobrepõem na camada superior do mesmo. A adaptação do fungo ao microambiente é mediada por atributos de *fitness*, resposta ao estresse, flexibilidade metabólica, absorção de diferentes compostos, regulação de pH (MAYER; WILSON; HUBE, 2013). Alguns fatores de virulência descritos podem ser visualizados na Figura 4.

Figura 4. Mecanismos de patogenicidade em *Candida albicans*



Fonte: MAYER; WILSON; HUBE (2013), com permissão.

Na descrição acima, pode ser observada a expressão de diversos fatores de virulência, como por exemplo, formação de proteínas de adesão da superfície celular, denominadas de adesinas (adesinas do tipo Als, EAP1, Hwp1, Rbt1, MP65, Csh1, PRA1, entre outras) que são reguladas por um grande número de vias reguladoras transcricionais, secreção de enzimas hidrolíticas (aspartil proteinases, fosfolipases), defesa contra espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (O'DONNELL; ROBERTSON; RAMAGE, 2015), a formação de biofilmes com tipos celulares heterogêneos que exibem tanto maior resistência a antifúngicos do que as células plantônicas de *C. albicans* quanto uma grande expressão de adesinas (DESAI e MITCHELL, 2015), a transição morfológica conforme supra-explicitado, entre outros.

2.4.3 Espécie *Candida tropicalis*

Leveduras de *C. tropicalis* são clinicamente encontradas em indivíduos neutropênicos que se sujeitaram a terapia intensiva para tratamento de câncer, os que passaram por tratamentos no qual se fazia necessário o uso de cateteres por longos períodos, aqueles que fizeram uso de antibioticoterapia intensa, pacientes com quadro de diabetes melitus, os com idade avançada ou algumas das situações combinadas (DEORUKHKAR; SAINI; MATHEW, 2014; NEGRI et al., 2010).

Tem sido relatado que *C. tropicalis* é uma das espécies de *Candida* mais diagnosticadas em isolados clínicos, tornando-se responsável por diferentes tipos de infecções, onde os tratos gastrointestinais e urinários são importantes portas de entrada. Fungemias causadas pela espécie são observadas com maior frequência em pessoas com câncer, com idade avançada, apresentando taxa de mortalidade mais elevada do que a de outras espécies (MUÑOZ, et al., 2010).

Apesar de sua relevância como patógeno humano, o seu potencial enquanto agente infeccioso ainda é pouco conhecido (MORALEZ et al., 2014). Entretanto, diversos fatores de virulência da espécie estão relacionados à sua patogenia, sendo alguns já conhecidos, e outros ainda em processo de estudo. Estes fatores de virulência são comuns à maioria das espécies de *Candida*, mas apresentam atributos específicos (DEORUKHKAR; SAINI; MATHEW, 2014).

Entre os fatores de virulência identificados para *C. tropicalis* podemos citar: secreção de enzimas hidrolíticas extracelulares como as proteinases arpárticas, fosfolipases, coagulases e gemolíticas, que possuem fundamental importância para invasão de tecidos e órgãos;

ruptura de membranas celulares (DAS e BALLAL, 2008); capacidade de promover hemólise para captação de ferro (FRANÇA et al., 2010) e induzir coagulação do plasma sanguíneo (DEORUKHKAR; SAINI; MATHEW, 2014).

Candida tropicalis apresenta alta capacidade de formação de biofilme, que lhe confere vantagens em relação 1) às defesas do hospedeiro, 2) resistência antifúngica significativa, 3) estabelece um reservatório que favorece reinfecções e 4) tem acarretado maior morbidade e taxas de mortalidade (DEORUKHKAR; SAINI; MATHEW, 2014). Outro atributo de patogenicidade de *C. tropicalis* é a capacidade de sofrer alteração fenotípica – comutação (MORALEZ et al, 2014), evento importante tanto para que o fungo possa se adaptar às alterações ambientais durante a infecção quanto para a regulação dos diversos tipos de caracterização de patogenicidade em *Candida* spp.

O dimorfismo celular da espécie, ou seja, a capacidade de poder sofrer alterações de uma forma celular para outra (levedura-psuedohifa-hifa) através de transição morfológica, figura ainda como um importante fator de virulência, sendo que o gene *efg1* tem um papel chave em diversos processos de virulência tais como filamentação, formação de biofilme e de comutação branco-opaca e regulação de transições morfológicas conforme ocorre também em *C. albicans* (MANCERA et al, 2015).

2.4.4 Resistência de espécies de *Candida* a drogas antifúngicas

Problemas com a suscetibilidade de espécies de *Candida* têm sido uma constante, uma vez que o surgimento de importantes mecanismos de resistência fúngica a fármacos disponíveis tem sido registrado em vários trabalhos (ARENDRUP e PERLIN, 2014; JENSEN et al., 2015; SANGLARD e COSTE, 2015).

São descritos na literatura dois tipos de resistência aos medicamentos antifúngicos, sendo elas a microbiológica e a clínica. A resistência microbiológica se trata da ausência de susceptibilidade de um patógeno fúngico a um agente antifúngico, tendo sido constatada através de testes de susceptibilidade *in vitro* e comparado com outros isolados da mesma espécie. A resistência clínica diz respeito à “persistência de uma infecção fúngica” verificada após realização de tratamento adequado (SANGUINETTI; POSTERARO; LASS-FLÖRL, 2015).

Na resistência microbiológica são caracterizados dois tipos de resistência: a primária (ou intrínseca), observada naturalmente em determinados fungos, sem que tenha havido

exposição prévia a drogas, e a secundária (ou adquirida), verificada em linhagens que foram expostas previamente ao agente antifúngico, sendo dependente de expressão do gene alterado (KANAFANI e PERFECT, 2008).

Uma variedade de mecanismos bioquímicos já conhecidos, além de outros em estudo, contribuem para o aparecimento do fenótipo de resistência à drogas como a redução da captação ou o aumento do efluxo celular por meio de bombas, modificação ou degradação da droga dentro da célula, mudanças na interação da droga com o seu sítio alvo (mutações de ERG11), superexpressão do alvo alterado, desenvolvimento de percursos de desvio, alterações enzimáticas, entre outras, ou ainda a aditividade de mais de um mecanismo (MAYER; WILSON; HUBE, 2013; SEGATO, 2008). A dinâmica destes mecanismos é uma constante, sobretudo pelo aparecimento de novos aperfeiçoamentos e modificações, em uma evolução progressiva, o que dificulta cada vez mais a eficácia das terapias (PERLIN et al., 2015).

As opções terapêuticas disponíveis incluem azoles (fluconazol, voriconazol, posaconazol e isavuconazole) e polienos (anfotericina B), cujo mecanismo de ação tem como alvo a modificação da membrana da célula, os ácidos nucleicos e proteínas, flucitosina (5-fluorocitosina) que interfere na síntese de DNA, RNA e proteínas fúngicas, e as equinocandinas (casposfungina, anidulafungina e micafungina) que agem na parede celular (PERLIN et al., 2015). O fluconazol especificamente age inibindo a via da biossíntese do maior componente da membrana celular dos fungos, o ergosterol. Nesse processo, o fluconazol inibe a enzima lanosterol 14-alfa-desmetilase no sistema enzimático Citocromo P-450 dos fungos, que é codificada pelo gene ERG11. Dessa forma, o lanosterol não poderá ser convertido em ergosterol e conseqüentemente haverá acúmulos de precursores e alterações na membrana fúngica (CARRILLO-MUÑOZ et al., 2006; SANTOS JÚNIOR et al., 2005).

A anfotericina B é um antifúngico sistêmico de efeito terapêutico eficiente, mas de expressiva toxicidade (MENEZES et al., 2013). A resistência a este antifúngico tem sido considerada incomum com ocorrência de 1-3% e por conta disso, a descrição molecular dos mecanismos é pouco abordada. Relatos apontam que esta resistência está relacionada à existência de mutantes com baixos níveis de ergosterol, bem como a perturbações de níveis e composição de fosfolipídios na membrana fúngica, que podem ter sido ocasionadas pela expressão de genes ERG2, ERG3 e ERG11 (CUENCA-ESTRELA, 2014).

Resistência a agentes azólicos, entretanto, são bem mais comuns, tendo sido relatada para várias espécies de *Candida*, entre elas *C. tropicalis* e *C. albicans*. Para o fluconazol, por

exemplo, a taxa de resistência tem sido observada entre 10% e 25% e os isolados resistentes a este tem apresentado também, uma resistência cruzada com outros agentes azólicos.

Eventos relacionados com a resistência aos azólicos podem ser citados, como por exemplo, a expressão de genes CDR1, CDR2 e MDR1, responsáveis pelo desenvolvimento de bombas de efluxo, que expulsam substâncias consideradas nocivas à célula, resultando em baixas concentrações do antifúngico; alterações ou sobre-regulações da enzima alvo dos derivados azólicos lanosterol 14- α -demetilase, codificada pelo gene ERG11, provocando impedimento de ligação de azóis com o sítio enzimático; alterações genéticas como a duplicação cromossômica, a conversão genética e recombinação mitótica ou ainda a coexistência de vários destes mecanismos (CUENCA-ESTRELLA, 2014; MORSCHHÄUSER, 2016).

No que diz respeito às equinocandinas, a taxa de resistência ainda expressa níveis baixos (<2-3%), mas tem sido relatado um aumento na incidência em algumas espécies de *Candida* (PERLIN et al., 2015). As equinocandinas agem através de inibição não-competitiva com β sintase (1,3) D-glucano, enzima responsável pela biossíntese de β (1,3) D-glucano, um componente chave da parede da célula fúngica. A resistência verificada para as equinocandinas ainda estão em processo de deslindamento, entretanto, pode-se citar as respostas adaptativas de stress, resultando na elevação do teor de quitina da parede celular e substituições de aminoácidos ocasionadas por mutações de pontos em regiões codificantes de subunidades de genes FKS β (1,3) D-glucano que conferem resistência à droga por reduzir o impacto sobre a célula (BEYDA; LEWIS; GAREY, 2012; SANGUINETTI; POSTERARO; LASS-FLÖRL, 2015).

A problemática da resistência fúngica vem sendo amenizada com a introdução de novas formulações terapêuticas para o tratamento de infecções, entretanto, há uma tendência para a ocorrência de repetição de padrão, uma vez que o excessivo uso de antibioticoterapia favorecerá o desenvolvimento de novos mecanismos de resistência (O'DONNELL; ROBERTSON; RAMAGE, 2015). Torna-se premente a realização de novas pesquisas, inclusive com produtos naturais, para que seja possível encontrar fontes potencialmente bioativas que possibilitem a elaboração de novas formulações terapêuticas.

REFERÊNCIAS

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, U. P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. sSupl, 2006.

ARAÚJO, T. A. S.; MELO, J. G.; ALBUQUERQUE, U. P. Plantas medicinais. In: ALBUQUERQUE, U. P. (Org.). **Introdução à etnobiologia**. Recife: NUPEEA, 2014. P. 91-98.

ARENDRUP, M. C.; PERLIN, D. S. Echinocandin resistance: an emerging clinical problem? **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 27, n. 6, p. 484-492, 2014.

BACCHI, E. M.; OKAMOTO, M. K. H.; KATO, E. Morfoanatomia de folhas de *Psidium guajava* L.(Myrtaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, 2009.

BARBALHO, S. M. et al. *Psidium guajava* (Guava): a plant of multipurpose medicinal applications. **Medicinal Aromatic Plants**, v. 1, n. 104, p. 2167-0412.1000104, 2012.

BATISTA, R.D. S. R. et al. Bebida mista à base de goiaba (*Psidium guajava* L.) e palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*): desenvolvimento e aceitabilidade. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 60, n. 3, p. 285-290, 2010.

BEGUM, S. et al. Chemical Constituents of the Leaves of *Psidium guajava*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 51, n. 1, p. 137-138, 2015.

BEYDA, N. D.; LEWIS, R. E.; GAREY, K. W. Echinocandin resistance in *Candida* species: mechanisms of reduced susceptibility and therapeutic approaches. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 46, n. 7-8, p. 1086-1096, 2012.

BORBA, A. M.; MACEDO, M. Plantas medicinais usadas para a saúde bucal pela comunidade do bairro Santa Cruz, Chapada dos Guimarães, MT, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 4, p. 771-782, 2006.

BROWN, G. D. et al. Hidden killers: human fungal infections. **Science translational medicine**, v. 4, n. 165, p. 165rv13-165rv13, 2012.

BUTLER, G. et al., Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. **Nature**, v. 459, n. 7247, p. 657-662, 2009.

CALIXTO JÚNIOR, J. T. et al. Phytochemical analysis and modulation of antibiotic activity by *Luehea paniculata* Mart. & Zucc. (Malvaceae) in multiresistant clinical isolates of *Candida* Spp. **BioMed Research International**, v. 2015; 2015.

CAMACHO-HERNÁNDEZ, I. L. et al. Antifungal activity of fruit pulp extract from *Psidium sartorianum*. **Fitoterapia**, v. 75, p. 401-404, 2004.

CAMPOS, L. Z. O. **Etnobotânica do gênero *Psidium* L. (Myrtaceae) no Cerrado brasileiro**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Botânica. Universidade de Brasília, Brasília. 2010.

CHANG, C. H. et al. Unique bioactive polyphenolic profile of guava (*Psidium guajava*) budding leaf tea is related to plant biochemistry of budding leaves in early dawn. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 4, p. 944-954, 2013.

CHANU, T. R. et al. Screening for antidiarrheal activity of *Psidium guajava*: A possible alternative in the treatment against diarrhea causing enteric pathogens. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 6, p. 961-967, 2011.

CARRILLO-MUÑOZ, A. J. et al. Antifungal agents: mode of action in yeast cells. **Revista Española de Quimioterapia**, v. 19, n. 2, p. 130-9, 2006.

CHEN, X, et al. ASDCD: antifungal synergistic drug combination database. **PloS One**, v. 9, n. 1, p. e86499, 2014.

COSTA I. R. **Estudos evolutivos em Myrtaceae: aspectos citotaxonômicos e filogenéticos de Myrteae, enfatizando *Psidium* e gêneros relacionados**. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas. 2009.

COTTIER, F.; MÜHLSCHLEGEL, F. A. Sensing the environment: response of *Candida albicans* to the X factor. **FEMS microbiology letters**, v. 295, n. 1, p. 1-9, 2009.

CUENCA-ESTRELLA, M. Antifungal drug resistance mechanisms in pathogenic fungi: from bench to bedside. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. s6, p. 54-59, 2014.

DAS, V. M.; BALLAL, M. Proteinase and phospholipase activity as virulence factors in *Candida* species isolated from blood. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 25, n. 4, p. 208-210, 2008.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, v. 7, 2011.

DELARZE, E.; SANGULARD, D. Defining the frontiers between antifungal resistance, tolerance and the concept of persistence. **Drug Resistance Updates**, v. 23, p. 12-19, 2015.

DEORUKHKAR, S. C.; SAINI, S.; MATHEW, S. Virulence factors contributing to pathogenicity of *Candida tropicalis* and its antifungal susceptibility profile. **International journal of microbiology**, v. 2014, 2014.

DESAI, J. V.; MITCHELL, A. P. *Candida albicans* Biofilm Development and Its Genetic Control. **Microbiology spectrum**, v. 3, n. 3, 2015.

DUARTE, R., M.; PAULA, F. M. Morfodiagnose de *Psidium guajava* L., Myrtaceae. **Visão Acadêmica**, v. 6, n. 2, 2005.

- EGHAREVBA, H. O. et al. Broad spectrum antimicrobial activity of *Psidium guajava* Linn. Leaf. **Nature and science**, v. 8, n. 12, p. 43-50, 2010.
- FENNER, R et al. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 369-394, 2006.
- FERREIRA, M.R.A. et al. Antifungal activity of medicinal plants from Northeastern Brazil. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, n. 40, p. 3008-3013, 2013.
- FLORES, G. et al. Chemical composition and antioxidant activity of seven cultivars of guava (*Psidium guajava*) fruits. **Food chemistry**, v. 170, p. 327-335, 2015.
- FONSECA, J. F.; BOTELHO, A. C. F. Atividade antifúngica do extrato de folhas de *Psidium guajava* sobre leveduras do gênero *Candida*. **Revista da Faculdade de Odontologia de Porto Alegre**, v. 51, n. 1, p. 24-26, 2010.
- FRANÇA, E. J. G. et al. Hemólise produzida por *Candida tropicalis* isoladas de amostras clínicas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 3, p. 318-321, 2010.
- FRANZON, R. C. et al. **Araças do Gênero Psidium: principais espécies, ocorrência, descrição e usos**. Embrapa Cerrados, 2009.
- FREDA, S. A. **Doce em massa convencional e light de goiabas (*Psidium guajava* L.): estabilidade de compostos bioativos, qualidade sensorial e microbiológica**. Dissertação apresentada ao Programa de PósGraduação em Nutrição e Alimentos da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas, 2014.
- GACHET, M. S. et al. Assessment of anti-protozoal activity of plants traditionally used in Ecuador in the treatment of leishmaniasis. **Journal of ethnopharmacology**, v. 128, n. 1, p. 184-197, 2010.
- GHORBANI, A.; NAGHIBI, F.; MOSADDEGH, M. Ethnobotany, ethnopharmacology and drug discovery. **Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n. 2, p. 109-118, 2006.
- GIARETTA, A.; PEIXOTO, A. L. Myrtaceae da restinga no norte do Espírito Santo, Brasil. **Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão**, v. 37, n. 1, 2015.
- GOVAERTS, R., et al. **World Checklist of Myrtaceae**. Kew, Royal Botanic Gardens. 2008. 455p.
- GOW, N. A. R; HUBE, B. Importance of the *Candida albicans* cell wall during commensalism and infection. **Current opinion in microbiology**, v. 15, n. 4, p. 406-412, 2012.
- GUIRADO, O. A. A.; CUÉLLAR, A. C. Estrategias en la selección de las plantas medicinales a investigar. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 13, n. 3, 2008.
- GUPTA, G. K.; CHAHAL, J., ARORA, D. *Psidium guajava* Linn: Current Research and Future Prospects. **Journal of Pharmacy Research**, v. 4, n.1, p. 42-46, 2011.

GUTIÉRREZ, R. M. P.; MITCHELL, S.; SOLIS, R. V. *Psidium guajava*: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 117, n. 1, p. 1-27, 2008.

JENSEN, R. H. et al. Stepwise emergence of azole, echinocandin and amphotericin B multidrug resistance in vivo in *Candida albicans* orchestrated by multiple genetic alterations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, p. dkv140, 2015.

JESUS, M. C. F. **Levantamento das espécies de restinga utilizadas nas comunidades de Pontal do Ipiranga e Degredo, Linhares, ES**. Dissertação de Mestrado em Biodiversidade Tropical. Departamento de Ciências Agrárias e Biológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus. 2012.

JOSEPH, B.; PRIYA, M. Review on nutritional, medicinal, and pharmacological properties of guava (*Psidium guajava* Linn.). **International Journal of pharma and bio sciences**, v. 2, n. 1, p. 53-69, 2011a.

JOSEPH, B.; PRIYA, R. M. Phytochemical and biopharmaceutical aspects of *Psidium guajava* (L.) essential oil: a review. **Research Journal of Medicinal Plants**, v. 5, n. 4, p. 432-442, 2011b.

JUÁREZ-VÁZQUEZ, M. D. C. et al. Ethnobotany of medicinal plants used in Xalpatlahuac, Guerrero, Mexico. **Journal of ethnopharmacology**, v. 148, n. 2, p. 521-527, 2013.

KADOSH, D.; LOPEZ-RIBOT, J. L. *Candida albicans*: adapting to succeed. **Cell host & microbe**, v. 14, n. 5, p. 483-485, 2013.

KANAFANI, Zeina A.; PERFECT, John R. Resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 1, p. 120-128, 2008.

KIM, J.; SUDBERY, P. *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. **The Journal of Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 171-177, 2011.

KÖHLER, J. R.; CASADEVALL, A.; PERFECT, J. The spectrum of fungi that infects humans. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 5, n. 1, p. a019273, 2015.

LANÇAS, F. M. et al. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente “compatíveis”. **Scientia chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009.

LAPENNA, E. A. M. et al. Actividad bactericida y fungicida de algunas plantas utilizadas en la medicina tradicional venezolana. **Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel**, v. 34, p. 6-92, 2003.

LIU, Q. et al. Antifungal activity in plants from Chinese traditional and folk medicine. **Journal of ethnopharmacology**, v. 143, n. 3, p. 772-778, 2012.

MACÊDO, D. G. et al. Práticas terapêuticas tradicionais: uso e conhecimento de plantas do cerrado no estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil). **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 14, n. 6, p. 491-508, 2015.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química nova**, v. 32, n. 1, p. 214-222, 2009.

MANCERA, E. et al. Finding a Missing Gene: EFG1 Regulates Morphogenesis in *Candida tropicalis*. **G3: Genes| Genomes| Genetics**, v. 5, n. 5, p. 849-856, 2015.

MATOS F. J. A. Introdução à fitoquímica experimental. terceira ed. Fortaleza: Editora UFC, 2009.

MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119-128, 2013.

MAZUMDAR, S.; AKTER, R.; TALUKDER, D. Antidiabetic and antidiarrhoeal effects on ethanolic extract of *Psidium guajava* (L.) Bat. leaves in Wister rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 1, p. 10-14, 2015.

MENEZES, E. A. et al. Perfil de suscetibilidade de *Candida tropicalis* a antifúngicos sistêmicos. **Revista de Patologia Tropical**, v. 42, n. 1, 2013.

MICELI, M. H.; DÍAZ, J. A.; LEE, S. A. Emerging opportunistic yeast infections. **The Lancet infectious diseases**, v. 11, n. 2, p. 142-151, 2011.

MONGE, R.A.; ROMA'N, E.; NOMBELA, C.; PLA, J. The MAP Kinase signal transduction network in *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 152, n. 1, p. 905-912.

MORAES, R. G.; LEITE, I. C.; GOULART, E. G. **Parasitologia e micologia humana**. 5 ed. Rio de Janeiro: Editora Cultura Médica: Guanabara Koogan, 2008. 608 p.

MORAIS-BRAGA, M.F.B. et al. Phenolic composition and medicinal usage of *Psidium guajava* Linn.: antifungal activity or inhibition of virulence? **Saudi Journal Biological Science**, DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.09.028>, 2015.

MORALEZ, A. T. P. et al. Phenotypic switching in *Candida tropicalis*: association with modification of putative virulence attributes and antifungal drug sensitivity. **Medical mycology**, v. 52, n. 1, p. 106-114, 2014.

MORSCHHÄUSER, J. The development of fluconazole resistance in *Candida albicans*—an example of microevolution of a fungal pathogen. **Journal of Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 192-201, 2016.

MUÑOZ, P. et al. *Candida tropicalis* fungaemia: incidence, risk factors and mortality in a general hospital. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 10, p. 1538-1545, 2011.

NEGRI, M. et al. Examination of potential virulence factors of *Candida tropicalis* clinical isolates from hospitalized patients. **Mycopathologia**, v. 169, n. 3, p. 175-182, 2010.

O'DONNELL, L. E.; ROBERTSON, D.; RAMAGE, G. *Candida* Virulence Factors. In: **Oral Candidosis**. Springer Berlin Heidelberg, 2015. p. 7-19.

OJEWOLE, J. A. O.; AWE, E. O.; CHIWORORO, W. D. H. Antidiarrhoeal activity of *Psidium guajava* Linn.(Myrtaceae) leaf aqueous extract in rodents. **Journal of Smooth Muscle Research**, v. 44, n. 6, p. 195-207, 2008.

OLIVEIRA, A. G. **Diversidade de Myrtaceae das restingas de Conceição da Barra e São Mateus, Espírito Santo, Brasil**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Botânica. Escola Nacional de Botânica Tropical. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2013.

ORTEGA, M. et al. *Candida* species bloodstream infection: epidemiology and outcome in a single institution from 1991 to 2008. **Journal of Hospital Infection**, v. 77, n. 2, p. 157-161, 2011.

PADRÓN-MÁRQUEZ, B. et al. Antifungal activity of *Psidium guajava* organic extracts against dermatophytic fungi. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 41, p. 5435-5438, 2012.

PERERA, D. F. T. N.; FERNANDO, K. M. E. P.; WIJENDRA, W. A. S. Antifungal activity of secondary metabolites present in *Psidium guajava* leaves against dermatophytes. **Vidyodaya Journal of Science**, v. 19, n. 1, p. 01-13, 2014.

PERLIN, D. S.; SHOR, E.; ZHAO, Y. Update on antifungal drug resistance. **Current clinical microbiology reports**, v. 2, n. 2, p. 84-95, 2015.

PINTO, Angelo C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química nova**, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

RAJAN, S. et al. Anti-enteric bacterial activity of the traditional medicinal plants of Kanyakumari coast, Tamilnadu, India **Journal of Coastal Life Medicine** **Journal of Coastal Life Medicine**, v. 3, n. 8, p. 640-644, 2015.

REKHA, S.; VIDYASAGAR, G. M. Anti-Candida Activity of Medicinal Plants. a Review. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, Suppl 4, 2013.

RIBEIRO, E. L. et al. Aspectos das leveduras de *Candida* vinculadas às infecções nosocomiais. **NewsLab**, v. 64, p. 106-28, 2004.

ROBERTO, B. S. et al. Qualidade nutricional e aceitabilidade de barras de cereais formuladas com casca e semente de goiaba. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 74, n. 1, p. 39-48, 2015.

SANGLARD, D.; COSTE, A. T. Activity of Isavuconazole and other azoles against *Candida* clinical isolates and yeast model systems with known azole resistance mechanisms. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, p. AAC. 02157-15, 2015.

SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; LASS-FLÖRL, C.. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. **Mycoses**, v. 58, n. S2, p. 2-13, 2015.

SARDI, J. C. O. et al. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of medical microbiology**, v. 62, n. Pt 1, p. 10-24, 2013.

SASLIS-LAGOUDAKIS, C. H. et al. The use of phylogeny to interpret cross-cultural patterns in plant use and guide medicinal plant discovery: an example from *Pterocarpus* (Leguminosae). **PloS one**, v. 6, n. 7, p. e22275-e22275, 2011.

SANTOS JÚNIOR, I. D. et al. Características gerais da ação, do tratamento e da resistência fúngica ao fluconazol. **Scientia Medica**, v. 15, n. 3, 2006.

SHANKAR, J. et al. Using Bayesian modelling to investigate factors governing antibiotic-induced *Candida albicans* colonization of the GI tract. **Scientific reports**, v. 5, 2015.

SHRUTHI, D. S. et al. A review on the medicinal plant *Psidium guajava* Linn.(Myrtaceae). **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 3, n. 2, p. 162-168, 2013.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia Médica à luz de autores contemporâneos**. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

SILVA-DIAS, A. et al. Adhesion, biofilm formation, cell surface hydrophobicity, and antifungal planktonic susceptibility: relationship among *Candida* spp. **Frontiers in microbiology**, v. 6: 205, 2015.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ªed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC. 2010.

SINGH, M. et al. Metallic silver nanoparticle: a therapeutic agent in combination with antifungal drug against human fungal pathogen. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 36, n. 4, p. 407-415, 2013.

SOBRAL, M. et al. Myrtaceae in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB19888>>. Acesso em: 14 Out. 2015.

SOUSA, E. C. et al. Elaboração e aceitabilidade de produtos de panificação enriquecidos com semente de goiaba (*Psidium guajava* L.) em pó. **Holos**, v. 5, p. 199-210, 2014.

SPITZER M, et al. Cross-species discovery of syncretic drug combinations that potentiate the antifungal fluconazole. **Molecular Systems Biology**, v.7, n. 1, 499, 2011.

SRIWILAIJAROEN, N. et al. Antiviral effects of *Psidium guajava* Linn.(guava) tea on the growth of clinical isolated H1N1 viruses: Its role in viral hemagglutination and neuraminidase inhibition. **Antiviral research**, v. 94, n. 2, p. 139-146, 2012.

SUWANMANEE, S.; KITISIN, T.; LUPLERTLOP, N. *In vitro* screening of 10 edible thai plants for potential antifungal properties. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.

THENMOZHI, S.; RAJAN, S. GC-MS analysis of bioactive compounds in *Psidium guajava* leaves. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 3, n. 5, p. 162-166, 2015.

TZEC, J. A. Y. et al. Una revisión sobre la importancia del fruto de Guayaba (*Psidium guajava* L.) y sus principales características en la postcosecha. **Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias**, v. 19, n. 4, p. 74-82, 2010.

UCHOA, A. et al. Desenvolvimento de bolo doce elaborado com farinha de resíduos obtidos do processamento de polpa de goiaba (*Psidium guajava*, L.). **Nutrire**, v. 36, n. Suplemento, p. 61-61, 2011.

WEN, L., et al. Actividad antifúngica de cuatro plantas usadas em la medicina tradicional peruana. Aislamiento de 3'-Formil – 2',4',6' – trihidroxidihidrochalcona, principio activo de *Psidium acutangulum*. **Revista da Sociedade Química del Perú**, v. 77, p. 199-204, 2011.

WINK, M. Modes of action of herbal medicines and plant secondary metabolites. **Medicines**, v. 2, n. 3, p. 251-286, 2015.

ZHANG, Q. et al. Application of Chromatographic Techniques in the Detection and Identification of Constituents Formed during Food Frying: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 14, n. 5, p. 601-633, 2015.

ZHANG, Z. et al. Natural products inhibiting *Candida albicans* secreted aspartic proteases from *Tovomita krukovii*. **Planta Medica**, v. 68, n. 1, p. 49-54, 2002.

ZOTARELLI, M. F.; ZANATTA, C. L.; CLEMENTE, E. Avaliação de geléias mistas de goiaba e maracujá. **Ceres**, v. 55, n. 6, 2015.

ARTIGO 1

4 ARTIGO 1: *Psidium guajava* L., DA ETNOBIOLOGIA À VALIDAÇÃO CIENTÍFICA: EFEITO SOBRE MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS

Maria Flaviana B. Morais-Braga, Joara Nalyda P. Carneiro, Antonio Júdsen T. Machado, Antonia Thassya L. dos Santos, Débora L. Sales, Luciene F. Lima, Fernando G. Figueredo, Henrique Douglas M. Coutinho.

Artigo submetido ao periódico Journal of Ethnopharmacology

Fator de Impacto: 2.998

(Comprovante de submissão no Anexo D)



***Psidium guajava* L., da etnobiologia à validação científica: efeito sobre micro-organismos patogênicos.**

Maria Flaviana B. Morais-Braga^{a*}, Joara Nalyda P. Carneiro^a, Antonio Júdson T. Machado^a,
Antonia Thassya L. dos Santos^a, Débora L. Sales^b, Luciene F. Lima^b, Fernando G.
Figueredo^c, Henrique Douglas M. Coutinho^b.

^aDepartamento de Ciências Biológicas, Universidade Regional do Cariri, Crato, Ceará, Brasil.

^bDepartamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri, Crato, Ceará, Brasil.

^cFaculdade Leão Sampaio, Juazeiro do Norte, Ceará, Brasil.

* Autor correspondente. Universidade Regional do Cariri, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Ciências Biológicas, Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Av. Cel. Antonio Luiz, 1161. Pimenta, Crato - CE. Brasil. CEP: 63105-000. Fone: +55 (88) 31021212; Fax: +55 (88) 31021291; e-mail: flavianamoraisb@yahoo.com.br

RESUMO

Relevância etnofarmacológica: O uso popular de plantas tem direcionado pesquisas farmacológicas destinadas a combater micro-organismos patogênicos. A espécie *Psidium guajava* L. é apontada como uma planta de grande versatilidade de uso tanto na alimentação quanto como agente terapêutico. Raiz, caule, folhas, frutos, flores e sementes são aproveitados para fins medicinais, especialmente através de infusões e decocções, para uso oral e tópico. *P. guajava* é utilizada para tratamento de sintomatologias relacionadas ao mau funcionamento do organismo e de doenças causadas pela ação de micro-organismos patogênicos e/ou oportunistas. Muitas pesquisas farmacológicas têm sido realizadas com a finalidade de validar cientificamente seu potencial terapêutico.

Objetivo do estudo: Este trabalho tem como objetivo relacionar o uso popular e a validação científica da planta como agente terapêutico no tratamento de doenças e sintomatologias causadas pela ação de protozoários, fungos, bactérias e vírus.

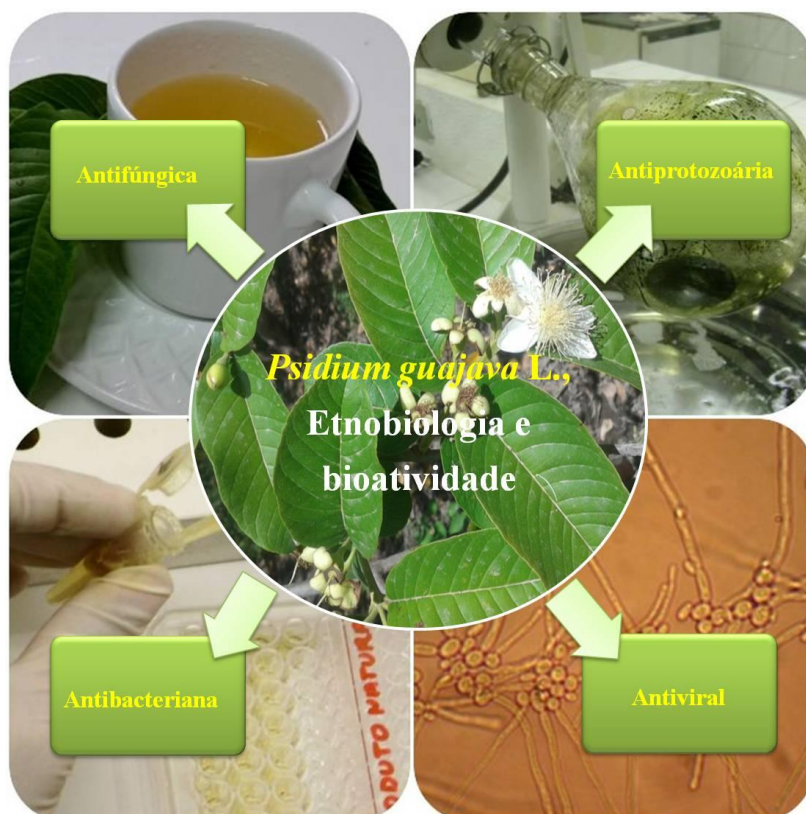
Material e métodos: Um banco bibliográfico foi montado com publicações relacionadas à etnobiologia de *Psidium guajava* (2005 – 2015) e pesquisas farmacológicas voltadas para comprovação do potencial bioativo no tratamento e cura de infecções e parasitoses (2010-2015). Para tanto foram feitas pesquisas em bases de dados de divulgação científica (Pubmed, Web of Science, Scopus), utilizando buscadores como Google Chrome e Sci-hub.

Resultados: *P. guajava* foi citada e validada cientificamente para o tratamento de doenças causadas por protozoários (leishmaníase, malária, giardíase, amebíase e tricomoníase), fungos (dermatoses, doenças sistêmicas e mucocutâneas), bactérias (infecções respiratórias, infecções mucocutâneas, infecções gastrointestinais, cólera, gastrites e úlceras estomacais, infecções bucais e periondontais, doenças venéreas e infecções urinárias) e vírus (herpes, gripe, rotavirose e AIDS).

Conclusões: As pesquisas relatadas enaltecem o potencial e a versatilidade terapêutica da espécie *P. guajava*, ao passo que também reforçam a eficiência da etnobiologia como direcionadora de estudos farmacológicos.

Palavras-chave: Goiabeira, antiprotozoária, antifúngica, antibacteriana, antiviral.

Resumo gráfico



Conteúdo

1. Introdução
 2. Material e métodos
 3. Resultados
 - 3.1 Uso etnomedicinal de *Psidium guajava*
 - 3.2 Validação científica do potencial farmacológico baseado em estudos etnodirigidos.
 - 3.2.1 Atividade antiprotozoária
 - 3.2.2 Atividade antifúngica
 - 3.2.3 Atividade antibacteriana
 - 3.2.4 Atividade antiviral
 - 4 Toxicidade de *Psidium guajava*
 - 5 Percepções de estudo e conclusões
- Referências

1. Introdução

Psidium guajava L. pertence ao Reino: Plantae, Divisão: Magnoliophyta, Classe: Magnoliopsida, Subclasse: Rosidae, Ordem: Myrtales Família: Myrtaceae, subfamília: Myrtoideae, Gênero: *Psidium* e espécie: guajava e é conhecida mundialmente no meio científico pela nomenclatura binomial: *P. guajava* (Ravi e Divyashree, 2014). É uma espécie de ocorrência em países de clima tropical e subtropical, nativa das Américas Central e Latina, que se adapta bem a uma grande variedade de solos, exceto àqueles com alto teor de argila, baixa capacidade de drenagem, ácidos e salinos (Natale et al., 2012; Natale et al. 2007; Salazar et al, 2006). Pode ser introduzida em muitos países, desde que disponham de temperatura entre 15 e 30 °C, sendo esta um importante determinador de produção, e suprimento de água adequado na faixa de 1000–2000 m³/ha por ano. É conhecida em diversas partes do mundo e amplamente cultivada em pomares e quintais, produzindo um fruto conhecido como goiaba (Dakappa et al., 2013; Gupta et al., 2011)..

De acordo com “The Plant List” (2016) a espécie *P. guajava* pode ser conhecida pelas sinónimas *Guajava pumila* (Vahl) Kuntze, *Guajava pyrifer* (L.) Kuntze, *Myrtus guajava* (L.) Kuntze, *Psidium angustifolium* Lam., *Psidium cujavillus* Burm.f., *Psidium*

cujavus L., *Psidium fragrans* Macfad., *Psidium igatemyense* Barb. Rodr., *Psidium intermedium* Zipp. ex Blume, *Psidium pomiferum* L., *Psidium prostratum* O. Berg, *Psidium pumilum* Vahl, *Psidium sapidissimum* Jacq., *Psidium vulgare* Rich., *Syzygium ellipticum* K.Schum. & Lauterb. Também chamada goiaba ou goiabeira é considerada um grande arbusto tropical ou uma pequena árvore frutífera com altura até 7 metros. Possui tronco curto e casca escamosa e copa aberta, as folhas são coriáceas com nervuras salientes e suas flores são brancas. O fruto, do tipo baga, possui polpa firme e muitas sementes, casca fina a grossa, sabor doce a muito ácido e pode ter forma de pera, ser redondo ou ovoide (Rishika and Sharma, 2012; Souza et al. 2011).

Sua constituição química engloba a presença de taninos, fenóis, flavonoides, saponinas, carboidratos, alcaloides, esteróis, terpenoides, compostos fenólicos, entre tantos outros (Barbalho et al., 2012; Dakappa et al., 2013; Gutiérrez et al., 2008; Thakur and Vikrant, 2014; Thenmozhi and Rajan, 2015). Os compostos de reconhecida atividade antimicrobiana, tais como 1,2-Benzeno-dicarboxilato de dibutila, alfa-bisabolol, 1,2-Benzeno-dicarboxilato de butila, hexadeca-2,6,10,14-tetraen, cariofileno, germacreno (Thenmozhi e Rajan, 2015), quercetina, 3-O- α -L-arabinofuranose-quercetina, 3-O- β -D-arabinopiranosose-quercetina (Metwally et al., 2010) morin-3-O-lyxoside, morin-3-O-arabinósido, quercetina e quercetina-3-O-arabinósido (Rattanachai Kunsopon e Phumkhachorn, 2010), 11-hidroxi-35-tricont-eicosano, pentatriacontano hexadecano-16-ol, tricosan-17-eno-5-ol, nonacosan-23-eno-3-ol (Mehta et al., 2012), lupeol, ácido betulínico (Ghosh et al., 2010) e com atividade contra *Leishmania* spp. (nerolidol) (Thenmozhi e Rajan, 2015), também foram encontrados nas folhas de goiaba.

Psidium guajava produz frutos comestíveis, e, portanto, agrega valor de consumo e valor produtivo, uma vez que tem grande aceitação tanto *in natura*, com alto valor nutritivo adaptável a qualquer tipo de dieta. Quando desidratada e industrializada, também pode ser destinada ao consumo humano através das possibilidades de fabricação de doce, geléia, pasta, frutos em calda, purês, refrescos, xaropes, sorvetes, molhos salgados e agridoces, produtos lácteos fermentados, entre outros (Chauhan et al., 2015; Oliveira et al. 2012; Natale, 2009).

Além do uso alimentício, suas partes têm sido utilizadas pelas populações para tratamento de enfermidades. Isoladamente ou associada a outras plantas de importância medicinal, a espécie tem sido um componente terapêutico vastamente utilizado por populações locais em todo o mundo (Gutiérrez et al., 2008; Sanda et al., 2011).

Devido à importância medicinal de *P. guajava*, vários trabalhos têm sido produzidos relatando tanto o seu histórico etnobiológico, quanto as investigações científicas relacionadas à comprovação de efeitos farmacológicos em geral. Neste trabalho seremos mais específicos, abordando exclusivamente o uso medicinal para tratamento de doenças e sintomatologias relacionadas com a ação de micro-organismos patogênicos/opportunistas, sejam eles protozoários, bactérias, fungos ou vírus, evidenciando também as validações científicas que atestam o potencial da espécie contra tais micro-organismos. Em um contexto mundial, onde muitas populações sentem o impacto da pobreza, da negligência da indústria farmacêutica e da resistência a antimicrobianos convencionais, este estudo traz um recorte etnobiológico e etnofarmacológico da espécie *P. guajava* no cenário da microbiologia clínica, apontando interessantes resultados de atividades biológicas como ponto de partida para o aprofundamento de pesquisas científicas no campo da farmacologia.

2. Material e métodos

O levantamento sistemático da literatura sobre relatos etnobotânicos de *P. guajava* foi realizado para compor uma coletânea de publicações que evidenciassem sua importância medicinal para o tratamento de sinais, sintomas associados, bem como doenças causadas por micro-organismos. A nomenclatura aceita para a espécie, *Psidium guajava* L. (The Plant List), foi utilizada na busca. Não foram usadas sinônimas. Os artigos citados foram publicações disponibilizadas nos anos de 2005 a 2015. Foram usadas as combinações de palavras “*Psidium guajava* + etnobotânica” e “*Psidium guajava* + medicinal”. Para a validação científica, a cronologia da busca foi para o período que compreende os anos 2010 a 2015 e a combinação de palavras usadas foram sempre a espécie “*P. guajava* + atividade biológica”, como por exemplo, atividade antibacteriana ou ainda o agente etiológico + *P. guajava*, como por exemplo, *Leishmania* + *P. guajava*. Além das bibliografias da etnobiologia de *P. guajava* e da validação científica de suas atividades biológicas, uma bibliografia auxiliar foi utilizada, sem delimitação de período, para a descrição de *P. guajava* e de seus aspectos ecológicos, para listar e relacionar os principais micro-organismos de importância clínica e doenças causadas por estes, para relatar a toxicidade da planta. A pesquisa foi realizada utilizando bases de dados com publicações científicas (Pubmed, Scopus, Web of science), sendo utilizados também os buscadores Google Scholar e Sci-hub.

3. Resultados

3.1 Uso etnomedicinal de *Psidium guajava*

Na consulta geral da etnobiologia de *P. guajava* foram utilizados artigos abordando o uso da espécie como agente terapêutico em diversas localidades, sendo referenciados aqueles que contemplavam a maior variedade de usos e/ou citações exclusivas para determinado uso. Nesta busca foi utilizada uma delimitação de período mais extensa na tentativa de encontrar o maior número de informações sobre a indicação da planta, partes utilizadas, interações e formas de uso no tratamento de doenças e sintomatologias relacionadas a micro-organismos. Foram utilizados nesta consulta 60 artigos abordando o uso medicinal de *P. guajava*, entre estes, 16 artigos de revisão.

Da espécie *P. guajava*, para fins medicinais, se aproveita quase tudo, entretanto, as flores são a parte menos utilizada. As folhas são geralmente utilizadas no preparo de infusão ou decocção, nos famosos banhos de acento e chazinhos medicinais para controle de diabetes, distúrbios gastrointestinais e inflamatórios, problemas vaginais, reumatismos e dores, afecções respiratórias, doenças causadas por micro-organismos, entre outras enfermidades (Dakappa et al., 2013; Gutiérrez et al., 2008; Mitchell and Ahmad, 2006; Picking et al., 2015).

Sob a forma de emplastro, unguentos, pasta ou ainda cataplasma para uso tópico, cascas, folhas ou raízes são usadas no tratamento de feridas, ulcerações e infecções de pele. Palitos de *P. guajava* são mastigados e utilizados entre os dentes para limpeza e a decocção das folhas e casca da raiz é usada como gargarejo para dores de garganta, laringite, inchaço na boca e ulcerações. Folhas jovens são mastigadas para tratar dor de dente e tinturas são preparadas para uso oral, no tratamento de doenças bucais. Estas indicações e formas de uso podem ser conferidas em Dakappa et al. (2013), Gupta et al. (2011), Gutiérrez et al. (2008) and in Kukreja and Dodwad (2012).

A espécie é usada como planta medicinal nos países dos continentes americanos, Ásia, África e Oceania, como listado na Tabela 1. Uma série de sinais e sintomas que podem ser observados em doenças causadas por Micro-organismos pode ser tratada por *P. guajava*, conforme pode ser conferido na Tabela 2. A parte utilizada, a indicação e a forma de uso, entretanto podem variar de acordo com o contexto cultural, mas na região tropical e adjacências o potencial terapêutico de *P. guajava* tem sido bem reconhecido e disseminado.

3.2 Validação científica do potencial farmacológico baseado em estudos etnodirigidos

Na busca por pesquisas de validação de atividade biológica, foi encontrado o maior número de artigos para atividade antibacteriana, seguida de antiprotozoária, antifúngica e antiviral. Os artigos citados para bioatividade totalizaram 51 publicações.

Esta seção apresenta validações científicas para o uso popular de *P. guajava* contra micro-organismos causadores de doenças que afetam os seres humanos. Um resumo das pesquisas que cientificamente validam o uso medicinal de *P. guajava* pode ser visto na Tabela 3.

3.2.1 Atividade antiprotozoária

Partes de *P. guajava* tem sido usadas para o tratamento da leishmaniose (Gachet et al., 2010). A casca do caule é pulverizada, as folhas são maceradas e a aplicação tópica é realizada a frio no ferimento. Para saber se a planta exerce efeito sobre o protozoário *Leishmania donovani*, Gachet et al. (2010), investigou, *in vitro*, o potencial de extratos diclorometano e metanólico de casca de *P. guajava* (30 a 0,041 µg/mL), verificando porém, que estes exibiam baixa atividade leishmanicida sobre formas amastigotas (encontradas dentro do flebotomíneo), em relação a outras plantas avaliadas e também citadas pelas populações. Um outro estudo realizado por Gawad et al. (2015) utilizando o extrato etanólico das folhas de *P. guajava* (80 µg/mL) verificou que este exerce 90.3% de inibição contra formas promastigotas de *Leishmania donovani*, que parasitam os hospedeiros vertebrados, incluindo humanos.

O uso de *P. guajava* por meio de infusão e decocção de folhas, raízes e sementes (Ariwaodo et al., 2012) para o tratamento da malária tem sido registrado em estudos etnobotânicos e merecido a atenção de etnofarmacologistas que já investigaram seu potencial tanto *in vitro* como *in vivo*, encontrando resultados interessantes. Gachet e colaboradores (2010) testaram o extrato diclorometano (casca) contra *Plasmodium falciparum* K1, sendo constatada a inibição do protozoário em percentuais acima de 80% e com CI₅₀ de 2,7 µg/mL. O extrato ciclohexano (10 µg/mL) de folhas da espécie quando testado *in vitro* por Chenniappan e Kadarkarai (2010) frente a uma linhagem de *P. falciparum* cloroquina-resistente mostrou atividade moderada (69%) e teve seu efeito potencializado quando combinado à cloroquina (extrato da planta + CQ = 5 µg/mL + 0,02 µM/mL,

respectivamente), exibindo um expressivo sinergismo atingindo 80% de atividade antiplasmodial. Chinchila e colabores (2011 e 2012) investigaram o potencial antimalárico de 25 plantas da Costa Rica, testando entre elas, extratos hidroetanólicos de todas as partes de *P. guajava* tanto frescas quanto secas. Seus experimentos foram realizados frente à *Plasmodium berghei* ATCC NK65. No teste *in vitro* com os extratos, a planta foi considerada muito ativa como menor CI₅₀ registrada para o extrato das flores secas (1 µg/mL). Em testes realizados com ratos, no entanto, demonstraram baixa atividade, com percentuais variando de 30 a 50%, sendo a menor CI₅₀ (70 mg/kg) atribuído ao extrato seco da fruto madura. A avaliação individual e combinada de extratos com diferentes polaridades (eter de petróleo, diclorometano, acetato de etila, metanol e aquoso) de *P. guajava* e de outras espécies (*Citrus limon*, *Carica papaya*, *Cymbopogon citratus* e *Vernonia amygdalina*) foi investigada por conta do uso etnomedicinal em comunidades nigerianas. Linhagens de *Plasmodium falciparum* sensível (D10) e resistente (Dd2) à cloroquina foram utilizadas tendo sido observado efeito antiplasmodial tanto de espécies individualmente quanto em associação (de duas em duas, com concentrações fixas de uma espécie – 50% e variadas da outra – 50%, 25% e 5%). O melhor efeito verificado para *P. guajava* foi do extrato diclorometano (folhas) com CI₅₀ de 6 µg/mL. Entretanto, no último caso o efeito antiparasitário foi potencializado a partir da combinação de fitoconstituíntes de mais de uma espécie, sendo observados os melhores índices de concentrações fracionadas (ICF) para *C. limon* + *P. guajava* (1,99), *C. papaya* + *P. guajava* (2,39) e *C. citratus* + *P. guajava* (2,58) contra D10. As espécies provavelmente atingiram mais de um alvo, o que poderia ser uma alternativa no combate à resistência do parasita (Melariri et al., 2012).

Em Camarões, Nefang, um produto fitoterápico que tem como componentes as espécies *Mangifera indica* (casca e folhas), *P. guajava*, *Carica papaya*, *Cymbopogon citratus*, *Citrus sinensis* e *Ocimum gratissimum* (folhas) é usado para tratamento da malária causada por *P. falciparum*. Uma avaliação *in vitro* por atividade antiplasmodial foi procedida utilizando cepas 3D7 e Dd2 do parasita. As espécies foram testadas individualmente e em combinação. *P. guajava* apresentou potencial antiparasitário para extrato aquoso e etanólico das folhas com CE₅₀ inferior a 38 µg/mL e quando combinada, seu extrato aquoso apresentou relação sinérgica (Índice de Combinação IC < 0,7) com ambos os extratos aquosos de *M. indica*, enquanto o extrato etanólico demonstrou aditividade com todos os outros, com exceção do extrato etanólico da casca de *M. indica* (Tarkang et al., 2014).

Testes *in vivo* foram realizados por Rajendran et al. (2014) utilizando extratos aquosos de folhas e frutos verdes de *P. guajava* frente a estirpe resistente à cloroquina NK65 de *Plasmodium berghei*. Dosagens foram administradas oralmente em ratos infectados durante sete dias sendo observado que a parasitemia foi reduzida à medida em que se aumentava a concentração dos produtos naturais, com percentual de supressão de 85,8% e 62,0% (1000 mg/kg). Uma atividade antiplasmodial também foi observada testando-se os extratos metanólico e acetato de etila de *P. guajava* tendo sido obtidas CI_{50} de 15 e 12,5 $\mu\text{g/mL}$ dos respectivos extratos contra cepas de *P. falciparum* cloroquina-sensível (3D7) e CI_{50} de 9 e 18 $\mu\text{g/mL}$ frente a cepas cloroquina-resistente (INDO). A atividade antiplasmodial foi considerada dose-dependente e de importância significativa, validando cientificamente o uso popular e direcionando pesquisas para produção de fármacos contra malária (Kaushik et al., 2015).

No Brasil *P. guajava* (folhas e broto do fruto) tem sido utilizada para o tratamento de giardíase. Para validar cientificamente o efeito da planta sobre o agente etiológico, Neiva e colaboradores (2014), testaram o extrato hidroetanólico de folhas da planta preparado por maceração e percolação contra trofozoitos de *Giardia lamblia*. Resultados mostraram uma atividade moderado para ambos os extratos com $CI_{50} \leq 500 \mu\text{g/mL}$. Em estudo anterior, a decocção das folhas foi investigada e para tanto, foi feita de acordo com forma de preparação local. A viabilidade de trofozoitos de *G. lamblia* foi afetada nas concentrações de 5% e 10% e o potencial anti giardial do chá das folhas de *P. guajava* foi comprovado (Birdi et al. 2011).

Formulações etnomedicinais são usadas no tratamento de infecções intestinais. Mistura de diversas plantas, por maceração a fresco e decocção, preparadas por povos da península de Yucatán tem a espécie *P. guajava* como componente terapêutico em pelo menos três preparações medicinais caseiras. Por conta disso, a espécie foi testada para determinar ação farmacológica *in vitro* sobre os parasitas causadores de infecções, *G. lamblia* e *Entamoeba histolytica*. A preparação por decocção (duas folhas de cada uma das plantas - *Teucrium cubense*, *P. guajava*, *Guazuma ulmifolia* e *Senna atomaria* – e uma pitada de bicarbonato de sódio) exibiu CI_{50} e CI_{90} de 14,33 $\mu\text{g/mL}$ e 139,67 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, contra *E. histolytica* e CI_{50} e CI_{90} de 50,05 $\mu\text{g/mL}$ e 769,66 $\mu\text{g/mL}$ contra *G. lamblia*. As demais preparações que continham *P. guajava* não exerceram efeitos significativos sobre os parasitas (Vera-Ku et al., 2010). Um ensaio *in vivo* utilizando ratos albinos Wistar de ambos os sexos foi conduzido para investigar o potencial anti amoebico, mostrou que o extrato metanólico (80%) das folhas frescas de *P. guajava* na concentração de 400 mg/Kg de peso

corporal, é tão eficiente na redução de parasitas (*E. histolytica*) quanto o fármaco de referência metronidazol na concentração de 125 mg/Kg (Inyang-Etoh e Ohanu, 2015).

O efeito de *P. guajava* foi avaliado sobre *Trichomonas vaginalis* uma vez que a planta é indicada para tratamento de doenças venéreas não-específicas, por meio do preparo de infusões de folhas e raízes. Os extratos diclorometano:metanólico e aquoso das folhas foram ativos contra o protozoário nas concentrações de 1 e 4mg/mL, respectivamente (Van Vuuren e Naidoo, 2010).

3.2.2 Atividade antifúngica

Um levantamento realizado na busca por plantas utilizadas no tratamento de sinais e sintomas relacionados às infecções fúngicas no Nordeste brasileiro, apontou a espécie *P. guajava* como sendo uma das plantas que, devido às indicações populares, apresenta potencial antifúngico (Fenner et al., 2006; Gutiérrez et al. 2008). Através do preparo de cataplasmas, decocções e infusões, *P. guajava* vem sendo utilizada para o tratamento de sintomas como leucorreia, aftas, úlceras, irritação vaginal e problemas na pele (Fenner et al., 2006; Gutiérrez et al. 2008). As infecções fúngicas tem gerado grande impacto na saúde pública devido ao crescente número de pacientes imunocomprometidos. Vários gêneros podem estar envolvidos nos processos infecciosos, como *Cryptococcus*, *Candida*, *Aspergillus*, *Pneumocystis* e *Coccidioidomycosis* (Brown et al., 2012) entre outros.

Um estudo realizado por Padrón-Márquez et al. (2012) relata a ação de extratos das folhas de *P. guajava* (50 mg/mL) frente a fungos dermatófitos. O extrato hexano apresentou efeito contra todas as linhagens (*Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Cryptococcus neoformans*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton rubrum* e *Sporotrix schenckii*), enquanto os extratos metanólico e de acetona foram ativos para 70% delas. As zonas de inibição variaram entre 10 e 19 mm.

Dois triperpenoides foram isolados a partir do extrato tolueno das folhas de *P. guajava*, sendo eles o ácido betulínico e o lupeol. Avaliando estes compostos contra fungos causadores de infecções superficiais e profundas, *Fusarium equisetiae*, *Curvularia eragrostidis* e *Alternaria alternata* (Ghohs et al., 2010), os pesquisadores verificaram CIMs variando entre 2,5 e 10 µg/mL.

Suwanmanee et al. (2014) testaram o efeito do extrato aquoso (bruto) de *P. guajava* contra fungos de importância clínica para humanos e animais, classificados em três grupos:

leveduras (*C. albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*), dermatófitos (*Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum*, *T. tonsurans*, *Epidermophyton floccosum*, *M. canis* e *M. gypseum*) e fungos filamentosos (*Aspergillus niger* e *Penicillium* spp). O extrato apresentou atividade contra todas as linhagens com CIM entre 2,67 e 16 mg/mL e zonas de inibição variando de 7 a 15 mm.

O extrato metanólico bruto de folhas de *P. guajava* e as frações também apresentaram atividade antifúngica quando foram ensaiados frente a linhagens de dermatófitos (*T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *Microsporum canis*, *M. gypseum* e *E. floccosum*). O extrato metanólico e as frações aquosa e acetato de etila foram bioativos contra todas as linhagens, com destaque para a fração acetato de etila que exerceu melhor efeito (CIM 6,25 at 25 mg/mL). As frações de hexano e clorofórmio, entretanto, não apresentaram efeito inibidor (Perera et al., 2014).

Egharevba et al. (2010) avaliaram os extratos hidrometanólico, metanólico, acetato de etila e hexânico das folhas de *P. guajava* contra *Candida albicans* ATCC e isolado. No teste por difusão, usando a concentração de 10 mg/mL e 20 mg/mL (hexano) verificou-se formação de halos variando de 15 a 30 mm e no teste de diluição em caldo a CIM variou de 1,25 a 10 mg/mL, com destaque para o extrato metanólico. Neste teste também foi verificada a inibição do crescimento de *M. gypseum* e *T. rubrum* pelos extratos metanólico e acetato de etila com halos de 14 a 17 mm e CIM de 5 mg/mL. Chanu et al. (2011) testou a atividade anti-*Candida* spp. dos extratos aquosos e etanólicos de *P. guajava* em concentrações de 1%, 3%, 5%, 7% e 9% por difusão, sendo verificado que o efeito foi dose dependente e os maiores halos verificados foram de 30 e 20 mm respectivamente.

Usando 20 µL de extrato hidroetanólico de folhas (70%), Fonseca e Botelho (2011) observaram inibição de crescimento de linhagens de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei*, com zonas de inibição de 14, 11 e 10 mm, respectivamente. Já os extratos aquosos, etanólico e de acetona das folhas apresentaram efeito sobre leveduras de *C. albicans*, *C. krusei*, *Candida glabrata* e *Candida dubliniensis*, com MIC variando de 15, 62 a 250 µg/mL (Ferreira et al., 2013). O extrato etnólico (30%) de folhas of *P. guajava* contendo 2,351 mg/g de taninos apresentou halo de inibição < 11 mm contra os fungos *Aspergillus niger* and *C. albicans* (Mailoa et al., 2014). Chanda and Kaneria (2011) verificaram que os extratos éter de petróleo, tolueno, acetato de etila, acetona e aquoso das folhas de *P. guajava* a uma concentração de 2,0 mg/poço exibiram zona de inibição com valores acima de 7 mm e

abaixo de 15 mm contra *C. albicans* e *Candida neoformans* e apenas os três extratos mais polares apresentaram atividade contra *Candida epicola*.

Morais-Braga et al. (2015), observaram que os extratos hidroetanólico (70%) e aquoso (infusão e decocção) das folhas de *P. guajava*, preparados conforme indicação popular, inibiram tanto o crescimento fúngico (CIM 8.192 µg/mL), quanto um dos importantes fatores de virulência de *C. albicans* e *C. tropicalis*, o dimorfismo celular. A inibição da transição morfológica foi dependente de concentração, com efeito máximo em 16.384 µg/mL.

3.2.3 Atividade antibacteriana

Psidium guajava tem sido usada para o tratamento de diversas doenças que sugerem atividade bacteriana como infecções respiratórias, problemas gastrointestinais, genitourinários, e relacionados com a saúde bucal, além de doenças como tuberculose e cólera. O macerado da casca da planta tem sido utilizado para o tratamento da tuberculose (Ogbole e Ajaiyeoba, 2010), a decocção das folhas é usada no preparo de chá a ser tomado três vezes ao dia para tratamento de infecções respiratórias (York et al., 2011); furúnculos e úlceras são tratados por infusão das folhas com uso oral (Otang et al., 2012); o tratamento de doenças infecciosas sexualmente transmissíveis é feito com a infusão de folhas e raiz (Vuuren e Naidoo, 2010); decocções de cascas e folhas são usados contra cólera (Sahu et al. 2014) e para o tratamento de infecções intestinais a decocção da casca é administrada 3 a 4 vezes ao dia e a infusão de folhas jovens é usada em associação com outras plantas para o tratamento de diarreias (Kadir et al., 2013). Este frequente uso popular da goiaba para o tratamento de infecções tem levado a pesquisas que visam comprovar seu efeito antibacteriano.

Entre as infecções respiratórias agudas mais presentes na população está a pneumonia, que pode ter causa viral, bacteriana ou fúngica. Dentre as bactérias causadoras da infecção, podemos encontrar *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Moraxella catarrhalis*, entre outras (Bjarnason et al., 2015; Souza, 2010).

Extratos metanólicos de folhas de *P. guajava* quando ensaiados frente a *S. aureus* revelou um potencial antibacteriano considerável, *in vitro*, apresentando Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 25 µg/mL e Concentração Bactericida Mínima (CBM) de 50 µg/mL (Madduluri et al., 2013). Este microrganismo além estar envolvido na etiologia de

infecções respiratórias também é responsável por infecções de pele, feridas e furúnculos para os quais *P. guajava* também é citada como agente terapêutico (Dakappa et al., 2013; Joseph and Priya, 2011; Tong et al., 2015).

Chanda e Kaneria (2011) pesquisaram plantas nutraceuticas da Índia em busca de potenciais agentes microbianos. Entre as plantas estava *P. guajava* que foi avaliada frente a 10 espécies de bactérias patogênicas entre elas *S. aureus* e *K. pneumoniae*. Foram avaliados diferentes tipos de extratos (éter de petróleo, tolueno, acetato de etila, acetona e aquoso) obtidos das folhas que variaram em polaridade e exerceram efeito antibacteriano significativo no ensaio *in vitro* realizado. A atividade antimicrobiana foi avaliada na concentração de 2.0 mg e a espécie se destacou como sendo a que revelou melhor potencial antibacteriano entre as avaliadas com zona de inibição expressando valores acima de 7mm e abaixo de 25 mm.

Um estudo preliminar realizado por Ifeanyichukwu et al. (2015) utilizando o extrato etanólico da folha e metanólico da casca de *P. guajava* evidenciou que estes extratos (100 mg/mL) mostraram-se ativos contra bactérias *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *S. pneumoniae* com zonas de inibição, evidenciadas em teste de difusão em disco. Para os extratos metanólico e etanólico das folhas a zona de inibição variou de 13 a 22 mm, enquanto que para extratos da casca a variação foi de 13-20 mm.

Micro-organismos como *S. pneumoniae*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* entre outros foram confrontados em ensaio *in vitro* com extratos etanólico e aquoso (10 µg/poço) de folhas e frutos de *P. guajava*. As folhas demonstraram melhor efeito que os frutos com zonas de inibição variando de 10 a 19 mm. Os extratos exerceram atividade variando de baixa a intermediária quando comparado a um antibiótico de referência e a bactéria que se mostrou mais sensível aos extratos foi *K. pneumoniae* (Philip et al., 2015).

Constituintes químicos pentapentacont-17, 31-diol (1), 11-hidroxi-35- tricont- pentatriacontanoate (2), 34-octahexacontanol (3), heptatriacont-8-ol (4), 14,15-dimetilo (cyclopropyl) -9-ol octadecyl-3- (4-hidroxifenil) propanoato de metilo (5), hexaeicosan-16-ol (6), pentatetracosan-10, 25-diol (7), untricontan-11, 19-diol (8), tricosan -17-eno-5-ol (9), e nonacosan-23-eno-3-ol (10) contidos no extrato etanólico das folhas de *P. guajava* foram isolados e posteriormente testados por difusão em disco contra bactérias (10 µg/disc). Os resultados apontam que os compostos 2, 6, 9 e 10 apresentaram moderada atividade (9 – 14 mm) contra *S. aureus* (Mehta et al., 2012).

Utilizada para tratamento de infecções respiratórias na África do Sul (York et al, 2012), *P. guajava* foi avaliada, na forma de extratos orgânico (CH₂Cl₂: MeOH) e aquoso das

folhas, contra diferentes linhagens bacterianas (padrão ATCC) mostrando-se eficaz contra *M. catarrhalis*, *K. pneumoniae* e *S. aureus*, com CIM dos extratos variando de 500 a 1000 µg/mL (York et al., 2012).

Devido ao uso medicinal de *P. guajava* contra tuberculose por populações de Uganda que utilizam a decocção duas vezes ao dia (Asiimwe et al., 2013) e da Malásia na medicina tradicional, o extrato hidrometanólico das folhas de *P. guajava* foi avaliado. Ibekwe et al. (2014) verificaram que o extrato apresentou alta atividade (<500 µg/mL) contra as bactérias *Mycobacterium bovis* BCG e *M. tuberculosis* H37Rv, com CIM de 466 µg/mL e 154 µg/mL, respectivamente.

P. guajava é muito indicada para o tratamento de infecções gastrointestinais. Diversos trabalhos relatam o uso de chás das folhas para o tratamento de diarreia e disenteria, cólera e problemas estomacais (Dakappa-Shruthi et al., 2013; Gómez-Estrada et al., 2011; Gutiérrez et al., 2008). Infecções intestinais podem ser causadas por vírus, bactérias e parasitas. Entre as espécies bacterianas causadoras de patologias intestinais podemos citar *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio* spp., *Escherichia coli*, *Clostridium difficile* entre outras (Bresee et al., 2012, Njume et al., 2012).

Avaliando o efeito de flavonóides isolados de folhas frescas de *P. guajava* 3-O-lixosemorina, 3-O-arabinose-morina, quercetina e 3-O-arabinose-quercetina, Rattanachaikunsopon e Phumkhachorn (2010) demonstraram que estes compostos exercem efeito bacteriostático sobre as bactérias enteropatogênicas *E. coli*, *Salmonella enterica* e *V. cholerae* (CIMs 40 a 152 µg/mL). Garode e Waghode (2014) destacaram o potencial antibacteriano dos extratos de clorofórmio, etanol, éter de petróleo e aquoso de folhas de *P. guajava* (50 µL/disc) contra a bactéria *S. typhi* com halos de inibição de 12, 18, 13 e 16 mm, respectivamente. Outro estudo também revelou potencial inibidor de crescimento de cinco isolados de *S. typhi* por extratos de *P. guajava* com efeito dependente de concentração, onde os melhores resultados foram observados para a concentração de 0,6 g/mL com halos de inibição variando de 10 a 15 mm e de 12 a 17 mm para os extratos de água fria e etanólico, respectivamente (Alo et al., 2012).

Ghohs et al. (2010) testou dois compostos isolados do extrato tolueno da folhas de *P. guajava* e verificaram que o ácido betulínico inibiu o crescimento de *E. coli* e *S. aureus*, com CIMs de 150 e 100 µg/mL respectivamente, enquanto o lupeol apresentou CIMs de 200 µg/mL frente a ambas as bactérias.

Na busca por biomoléculas de origem natural com potencial antibacteriano, tendo como base estudos etnobotânicos, seis plantas foram investigadas na Índia contra 14 isolados clínicos

de linhagens enteropatógenas responsáveis por infecções do trato gastrointestinal em humanos (*E. coli*, *Shigella spp.*, *S. typhi*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella sp.*, *Streptococcus faecalis* e *S. aureus*). Foram realizados testes por difusão em disco e os resultados foram confirmados através da determinação de CIM. Os extratos aquoso e etanólico de *P. guajava* (800 µg/disco) foram descritos como sendo ativos, com halos de inibição de 10,50 – 24,50 mm e 12,50 – 24,60 mm, onde o menor e o maior efeito foi verificado sobre *Enterobacter sp.* e *E. coli*, respectivamente. A CIM variou entre 41,66-383,33 µg/mL para o extrato aquoso e 41,66-216,66 µg/mL para o extrato etanólico, revelando que, das espécies de plantas avaliadas, *P. guajava* apresentou, no geral, os melhores resultados (Rajan et al., 2015).

Baseado no uso popular, o extrato aquoso das folhas de *P. guajava* preparado por decocção foi testado frente às bactérias *E. coli*, *V. cholerae* e *Shigella flexneri* causadoras de diarreia. O extrato inibiu o crescimento de *S. flexneri* (valor de CE₅₀ 0.98% ± 0.2%) e *V. cholerae* (CE₅₀ de 2.88% ± 0.36%) e diminuiu a produção de toxina termolábil de *E. coli* e a toxina colérica. Além disso, inibiu tanto a adesão de *E. coli* enteropatogênica quanto a invasão de *S. flexneri* e *E. coli* enteroinvasiva (Birdi et al., 2010). Uma atividade antibacteriana contra o agente causador da cólera foi evidenciada por Rahim et al. (2010). Seus estudos mostraram que o extrato bruto de folha e casca associados e o extrato metanólico das folhas apresentaram efeito contra o *V. cholerae* multi-droga resistente (MDR) nas concentrações inibitórias mínimas de 1250 µg/mL e 850 µg/mL respectivamente. Esses extratos foram armazenados em diferentes temperaturas (70, 80 e 100 °C) e depois testados para verificação da sua eficácia. Os resultados demonstraram que a elevação da temperatura não alterou a atividade de *P. guajava*, indicando que o extrato não é ativo pelas proteínas.

Contra *Helicobacter pylori*, uma das principais bactérias causadoras de doenças gástricas, diversas plantas usadas na medicina popular da Jordânia foram avaliadas. Entre estas, *P. guajava*, teve seu extrato etanólico (100.000 µg/mL) testado frente a isolados clínicos em ensaios *in vitro*, com resultados que mostraram que a espécie apresentou moderada atividade contra *H. pylori* (isolados 1 e 2) com zonas de inibição de 33 e 28 mm, respectivamente (Masadeh et al, 2014).. Diferentes tipos de extratos da planta foram investigados por Uyub e colaboradores (2010) contra a bactéria *H. pylori* demonstrando atividade inibidora com halos de inibição de 8.5 mm (éter de petróleo), 10 mm (clorofórmio), 33 mm (metanol) e 7 mm (água).

O uso de *P. guajava* para infecções bucais tem estimulado pesquisas farmacológicas. O extrato aquoso de *P. guajava* foi ensaiado contra micro-organismos causadores da placa dentária e cariogenicidade (*Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mitis* and *Actinomyces* sp.) e a CIM foi determinada variando entre 2.61 e 4.69 mg/mL (Fathilah, 2011). Os extratos aquoso, etanólico e hidroetanólico das folhas jovens de *P. guajava* (extração a quente e a frio) exibiram zona de inibição variando de 11,8 a 25 mm e atividade antiaderência e anticoagregação bacteriana em teste de consórcio no qual foram utilizadas as bactérias *Streptococcus mutans*, *S. mitis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mitior*, *S. sanguinis* e *Streptococcus milleri*, algumas com capacidade de formar biofilmes (John et al., 2013). Além disso, o extrato hidroetanólico das folhas de *P. guajava* em 100 mg/mL apresentou zona de inibição de 19 mm sobre *Streptococcus mutans* (Vieira et al. 2014). O extrato aquoso do galho de *P. guajava* também foi ativo contra a mesma bactéria com zona de inibição de 15 mm, apresentando efeito inibitório sobre a formação de biofilme (Chavan et al., 2014).

P. guajava é utilizada no tratamento de gonorreia e doenças venéreas não-específicas através da infusão de suas folhas e raízes na África do Sul. Extratos diclorometano-metanol e aquoso das folhas da *P. guajava* foram testados contra as bactérias *Oligella ureolytica*, *Ureaplasma urealyticum*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Gardnerella vaginalis* tendo sido verificado que a espécie apresentou efeito inibidor em concentrações que variaram de 0,8 a 1,5 mg/mL para o extrato diclorometano-metanol. O extrato aquoso foi bioativo em concentrações mais elevadas (6 a 16 mg/mL) contra *O. ureolytica*, *U. urealyticum* e *G. vaginalis* (Van Vuuren e Naidoo, 2010).

Infecções urinárias bacterianas têm sido tratadas por fármacos que podem ter como mecanismo de ação a inibição da urease. Na busca por outras alternativas terapêuticas, plantas medicinais usadas para tratamento desse tipo de infecção, entre estas, *P. guajava*, foram testadas para verificação do seu potencial anti-urease. Extratos metanólico, aquoso e com urina de vaca foram ensaiados frente a bactérias uréase-positivas e exibiram CIMs que variaram de 125 a 500 µg/mL para as bactérias *S. aureus* e *P. aeruginosa* (Bai et al., 2014). O extrato metanólico das folhas foi utilizado para avaliar o seu efeito inibidor na formação de biofilmes em cateteres urinários e Adesina et al. (2015) verificou que a presença do extrato atrasou a formação do biofilme de *E. coli* em uma semana e inibiu a proliferação das bactérias. Ao cobrir os cateteres com o extrato verificou-se inibição nas concentrações 5,0, 10,0 e 20,0 mg/ml (-1), com contagens bacterianas variando entre $4,3 \times 10^5$ (5) e $1,9 \times 10^3$ (3) após 120h e $7,7 \times 10^5$ (5) e $3,8 \times 10^5$ (5) para 128 h.

3.2.4 Atividade antiviral

O uso de *P. guajava* para o tratamento de infecções virais e sintomas associados tem sido relatado na literatura. Neste sentido, as folhas de *P. guajava* são utilizadas juntamente com a fruto de *Citrus lemon* e folhas de *Eucalyptus* sp. no preparo de uma bebida utilizada para tratamento da gripe por populações do Zimbábue (Maroyi, 2011). Infecções respiratórias são tratadas com a decocção das folhas de *P. guajava* administrada três vezes ao dia na África do Sul (York et al., 2011). Pessoas que vivem com HIV/AIDS são suscetíveis a infecções causados por micro-organismos oportunistas como o vírus da herpes, o rotavírus, entre outros. Assim sendo, por conta da fragilidade do sistema imunológico, uma série de sintomas são observados como diarreia, bolhas e feridas na pele e mucosas (Bosco et al., 2014; Faral-Tello et al. 2012; Kisangau et al., 2007). A infusão e o decocto da casca, da entrecasca e da folha da goiaba branca são usados no Brasil para o preparo de chá para ingestão ou bochecho para tratar herpes e feridas. Já o chá das folhas e cascas da goiaba vermelha (decocto e infusão) são tomados para diarreia (Borba e Macedo, 2006). Já no México, a infusão das folhas é feita e tomada para tratamento de herpes, diarreia, feridas e erupções cutâneas (Alonso-Castro et al., 2012).

Infusão de folhas de goiaba tem sido usada para o tratamento de herpes, doença causada pelo vírus Herpes simplex do tipo 1 (HSV-1). Faral-Tello et al. (2012) realizaram um ensaio com extratos de plantas usadas popularmente para o tratamento desta infecção viral. *Psidium guajava* foi uma das espécies avaliadas, cujo extrato hidroetanólico (70%) obteve expressivo resultado, com percentual de concentração de efetiva (CE₅₀) de 118 µg/mL, causando inibição *in vitro* de replicação do HSV-1 em células de rim de macaco (ATCC CCL-81).

A gripe, infecção respiratória causada por vírus, vem sendo tratada, em diferentes localidades, com o chá das folhas de goiaba. Em um *screening* de vários tipos de chás usados na medicina popular de países orientais como medicamentos alternativos antivirais, o chá da folha de goiaba, preparado por infusão, foi testado por Sriwilaijaroen et al. (2012), contra isolados clínicos do vírus H1N1(A/Narita/1/2009, A/Yamaguchi/20/06 e A/Kitakyushu/10/06 – resistente à droga oseltamivir), causador da pandemia em 2009. O chá apresentou uma forte atividade inibidora, agindo tanto no bloqueio à entrada do vírus da influenza, como na propagação deste. Seu mecanismo de ação foi verificado sobre glicoproteínas de superfície, como a hemaglutinina viral, impossibilitando a ligação do vírus à membrana celular na fase

inicial da infecção, e a neuraminidase, impedindo a formação de novos vírus. De acordo com os pesquisadores, os múltiplos constituintes químicos do chá podem agir em diversos alvos, acarretando um efeito sinérgico.

O rotavírus é um dos maiores responsáveis pelo acometimento de diarreias em crianças. Um dos principais usos de *P. guajava* na medicina popular é no tratamento de diarreias e distúrbios gastrointestinais. Tendo como base pesquisas etnodirigidas, Cecílio et al. (2012) investigaram 14 plantas medicinais indicadas para tal uso, que pudessem mostrar atividade contra o rotavírus simiano AS-11 *in vitro* em células de rim de macaco rhesus MA-104. Entre as plantas pesquisadas constava a espécie *P. guajava*. Os resultados revelaram que o extrato etanólico das folhas de goiaba não impediu a replicação viral nas células nas concentrações avaliadas (50 e 500 µg/mL). Entretanto, um estudo clínico chinês realizado em crianças com rotavirose, com tratamento à base de folhas de goiaba, demonstrou que a espécie apresentou significativo efeito curativo sem reações adversas (Juying et al., 2010).

O uso de *P. guajava* para tratamento de pacientes com HIV foi reportado por Lamorde et al. (2010) na Uganda e por Chinsebu et al. (2015) na Naníbia que relata o uso para tratar concomitantemente AIDS e tuberculose. Um estudo utilizando saponinas totais das folhas de *P. guajava* (TSGL) demonstrou que este concentrado foi capaz de inibir a glicoproteína gp160 do HIV com uma CI_{50} de 7,33 µg/mL e, além disso, teve efeito na fusão do vírus com a membrana celular com atividade inibidora de 95,93% a 25 µg/mL, pelo bloqueio da glicoproteína transmembrana viral gp41 (Mao et al., 2010).

4 Toxicidade de *Psidium guajava*

P. guajava é uma espécie que tem apresentado historicamente grande versatilidade e uso expressivo pelas populações de diversas localidades. Este fato tem levado a crer que a planta não apresenta toxicidade, pois isto seria atestado pelo longo histórico de uso que perpassa muitas gerações. Entretanto, a toxicidade de *P. guajava* tem sido averiguada em alguns ensaios farmacológicos a fim de que seja realmente comprovada a segurança em relação ao uso de chás, tinturas e outras formas de uso. E isto é importante porque, de acordo com Nasri and Shirzad (2013), plantas medicinais podem exercer amplos e múltiplos efeitos no organismo e por isso é necessário que sejam tomadas precauções.

Uma atividade citotóxica foi investigada por Melariri et al. (2012) utilizando células de ovário de rato chinês (CHO). O extrato diclorometano de folhas frescas apresentou uma

CI₅₀ em 85 µg/mL. Quando o extrato de *P. guajava* foi combinado a extratos de outras plantas (*C. papaya* ou *C. citratus* e *C. limon*) foi observada CI₅₀ acima de 100 µg/mL para os dois primeiros e 82 µg/mL para o último.

A citotoxicidade da infusão das folhas de *P. guajava* foi testada em macrófagos peritoniais de camundongos (*In vitro*). Almeida e colaboradores (2006) testaram a infusão tanto imediatamente após preparo, quanto algumas horas depois deste. O infuso recém preparado exibiu índice inicial de letalidade de 10%, que foi aumentando para 31,82% (4°C, 48 h) e 76,18% após 48 h, com 60 min. de exposição, revelando que a infusão nestas condições de tempo e estocagem, apresenta efeito imunotóxico.

O chá das folhas frescas por infusão foi investigado quanto a seu potencial citotóxico. Doses de 0,2, 2,0 e 20,0 g/dia de extrato aquoso foi administrado via intragástrica em ratos de ambos os sexos por um período de seis meses. Foram observados sinais de hepatotoxicidade e problemas renais, tais como hidronefrose (machos), nefrocalcinose e pielonefrite (fêmeas). Neste ensaio a DL₅₀ do extrato foi acima de 20,0 g/kg (Attawish et al., 1995).

O extrato etanólico (70%) das folhas de *P. guajava* foi avaliado quanto à toxicidade aguda e subcrônica por conta de seu uso na Nigéria. O teste de toxicidade aguda foi realizado em ratos com administração oral (1000-5000 mg/kg) sendo a DL₅₀ do extrato verificada em 1,352mg / kg. Na verificação da toxicidade subcrônica (150, 300, 600 and 1200 mg/kg) foi observada a elevação (time dose-dependent) dose-tempo dependente de aminotransferase aspartato (AST), alanina aminotransaminase (ALT) e fosfatase alcalina (ALP) na dose mais elevada, sugerindo hepatotoxicidade. Duas mortes foram verificadas no terceiro mês de administração (Onyekwe et al., 2011).

Estes relatos nos levam a supor que o uso inadequado de *P. guajava* ao invés de proporcionar bem-estar, poderá causar efeitos indesejáveis ao organismo humano. Assim sendo, cuidados devem ser tomados com a forma de preparo, o tempo de estocagem, a concentração usada no preparo da planta medicinal e com a sua interação com outras plantas e medicamentos. Os estudos etnomedicinais sugerem que não existe uma padronização geral quanto ao preparo dos chás e tinturas, nem quanto à forma de administração e sua relação com a toxicidade no organismo humano, permanecendo todos estes aspectos condicionados à cultura e costumes de uma determinada população.

5 Percepção do estudo e conclusões

O uso de *P. guajava* é especialmente intensificado em países onde as condições de vida são precárias e onde costumes e tradições populares são valorizados. O conhecimento sobre as práticas medicinais ainda é passado de geração em geração, embora em alguns locais este costume esteja se perdendo à medida em que os sistemas de saúde são modernizados e o acesso à medicação é popularizado. Este conhecimento é importante não apenas para os que dependem da medicina popular, mas também para aqueles que veem na ethnobotany e na ethnopharmacology uma oportunidade interessante para o rastreio de compostos ativos que exerçam efeitos sobre diferentes agentes etiológicos que provocam doenças nos seres humanos.

A indicação para o tratamento de transtornos gastrointestinais, cujo quadro clínico apresenta diarreia é o ponto forte da espécie, principalmente da variedade que apresenta frutos vermelhos. Por conta disso *P. guajava* tem sido muito utilizada em infecções causadas por micro-organismos que apresenta como um dos sintomas a diarreia. Em geral, a utilização terapêutica se baseia no preparo de medicamentos caseiros que tem como ingrediente principal as folhas jovens da planta, que é a parte mais utilizada, seguida da casca. As formas mais comuns de preparo são a decocção, a maceração e a infusão, embora tintura e pastas também sejam preparadas, especialmente para tratamento tópico de feridas nos casos de leishmaniose, micoses superficiais e infecções bacterianas. Em algumas localidades *P. guajava* também é utilizada junto a outras plantas medicinais, de acordo com o costume popular, e nesse caso é utilizada apenas uma parte das plantas, geralmente folhas, ou uma mistura de partes, como por exemplo, folhas, casca e raiz de duas ou mais plantas.

Muitos trabalhos de etnobiologia deixam consideráveis lacunas carecendo de informações detalhadas sobre formas de uso, tipo de preparo, administração, condição do produto natural utilizado e ainda se a planta é utilizada junto com um fármaco comercial ou até mesmo em conjunto com outras espécies. Esta última informação tem grande impacto por conta das interações de produtos naturais entre si e com fármacos. Algumas pesquisas tem mostrado que o uso de um produto natural em conjunto com um fármaco pode apresentar diferentes tipos de interações, como por exemplo, sinérgicas, aditivas, indiferentes ou antagônicas. E assim sendo, o uso de um produto natural pode prejudicar ou potencializar o efeito de um fármaco, ou vice versa. Algumas destas interações foram demonstradas na

descrição de trabalhos citados nesta revisão. Entretanto nenhum deles chegou realmente a utilizar metodologias para esclarecer o tipo de interação existente.

Nos estudos para validação científica do uso medicinal de *P. guajava* a folha também é a mais avaliada, seguida da casca. Entretanto é importante destacar a necessidade de pesquisar compostos ativos tanto em extratos secos quanto frescos, ambos de todas as partes do vegetal. A verdade é que a falta de uma investigação mais detalhada pode acabar acarretando em desperdício do potencial farmacológico de uma espécie.

Nas preparações dos extratos, solventes como água, água-etanol, etanol e metanol, ou seja, solventes polares são os mais utilizados e estes possuem a capacidade de extrair alcaloides, taninos e alguns tipos de flavonoides que possuem efeitos sobre variados tipos de micro-organismos patogênicos. Entretanto, compostos isolados de *P. guajava* ainda são pouco explorados, se levarmos em consideração a versatilidade da planta e sua importância etnomedicinal.

Nos testes de bioatividade *P. guajava* apresenta melhor efeito contra protozoários (*Leishmania* and *Plasmodium*) e bactérias, para os quais podemos encontrar resultados em baixas concentrações de extratos ou frações. Já para fungos e vírus a planta é ativa, entretanto carece de concentrações mais elevadas para que sejam observados efeitos sobre os micro-organismos.

Outro fato relevante são as diferenças de efeito nos testes realizados para uma mesma bioatividade. O emprego de metodologias diferentes podem gerar resultados diferentes, como é o caso da realização de testes microbiológicos utilizando diferentes metodologias como difusão em disco e microdiluição. Testes por difusão geralmente revelam alguma atividade de um produto, mesmo fraca, uma vez que as concentrações testadas são em miligramas, enquanto na maioria dos testes de microdiluição a concentração utilizada é em microgramas. Os testes de microdiluição são mais indicados a buscas farmacológicas, justamente pelas baixas concentrações utilizadas em sistema *in vitro*. Se uma planta exibe atividade (*in vitro*) apenas em altas concentrações, certamente será descartada a possibilidade de ser direcionada para uma pesquisa farmacológica, uma vez que para constituir um fármaco seriam necessárias altíssimas concentrações de um determinado composto a fim de que este possa agir em um complexo sistema *in vivo* onde, geralmente, em tais concentrações também exerceria efeitos tóxicos.

Para as atividades abordadas ainda há carências de estudos *in vivo*, talvez em decorrência de que alguns resultados *in vitro* foram obtidos em altas concentrações, ou ainda

por conta de *P. guajava* ter apresentado toxicidade em alguns estudos. Em alguns casos, onde o efeito é obtido em baixas concentrações, faltam, por exemplo, estudos sobre mecanismos de ação, que venham a elucidar o meio pelo qual extratos, frações ou compostos da planta causam a morte ou interfiram no mecanismo celular dos micro-organismos, inviabilizando sua multiplicação.

Embora os ensaios com extratos e frações apontem potencial farmacológico, conforme trabalhos citados, estudos utilizando compostos da planta contra micro-organismos não são tão comuns. Existe, portanto, a necessidade de aprofundar estudos, fracionando extratos, isolando compostos e realizando novos testes, sobretudo, para os casos onde a atividade biológica foi verificada em concentrações mais baixas, cuja toxicidade é inexistente para células humanas.

Em suma, *P. guajava* realiza importante papel na interação ecológica com o ser humano, possibilitando o seu bem estar tanto pela disponibilização de alimento quanto de matéria prima para finalidades terapêuticas.

Compostos que compõem o seu metabolismo apresentam-se bioativos contra diferentes tipos de micro-organismos causadores de patologias em humanos. A espécie é utilizada em preparações locais para tratamento de doenças e sintomatologias associadas. Testes farmacológicos com diferentes metodologias demonstraram os efeitos antimicrobianos da espécie, embora também tenham revelado, em alguns casos, a necessidade de doses crescentes para obtenção de efeito desejado. *P. guajava* mostrou-se ativa contra diferentes espécies de protozoários, fungos, bactérias e vírus.

As pesquisas relatadas enaltecem o potencial e a versatilidade terapêutica da espécie *P. guajava*, ao passo que também reforçam a eficiência da etnobiologia como direcionadora de estudos farmacológicos.

Tabela 1.Lista de países onde *Psidium guajava* é usada como planta medicinal

(continua)

País	Indicações de <i>Psidium guajava</i>	Referência(s)
Bangladesh	Diarreia, bronquite	Kadir et al. (2013); Khisha et al. (2012)
Bolívia	Diarreia	Hajdu and Hohmann (2012)
Brasil	Diarreia, leucorreia, aftas, úlceras, irritação vaginal, dor de dente, dor de garganta, herpes	Borba and Macedo (2006); Fener et al. (2006); Ribeiro et al. (2014)
Camarões	Malária	Betti et al. (2013)
Camboja	Dor de estômago	Laval et al. (2011)
Canadá	Infecções tóxicas, respiratórias, reprodutivas e gastrointestinais causadas por fungos	Jones et al. (2009)
China	Diarreia, dor de estômago, úlcera péptica	Ghorbani et al. (2011); Zheng et al. (2013)
Colômbia	Nervosismo	Gómez-Estrada et al. (2011)
Cuba	Catarro, helmintos	Volpato et al. (2009)
Equador	Leishmaniose	Gachet et al. (2010)
Etiopia	Ameba, diabetes	Regassa (2013)
Gana	Malária	Asasea et al. (2012),
Indonésia	Diarreia, dor de estômago	Mulyoutami et al. (2009)
Índia	Disenteria, doenças gastrointestinais, hemorrágico, diarreia, gastroenterite, tosse, úlceras, intestinos, cólera, febre, dor, diabetes, inflamação	Beverly and Sudarsanam (2011); Das and Choudhury (2010); Dey et al. (2010)
Quênia	Diarreia	Njoroge and Kibunga (2007)
Madagascar	Diarreia, disenteria	Rakotoarivelo et al. (2015)
Malásia	Doenças respiratórias, diarreia, dor de estômago	Mohamad et al. (2011); Ong et al. (2011)
México	Dor de estômago, vômito, herpes, diarreia, disenteria, feridas, erupções cutâneas, gastrite, vermicídeo, dor de dente, tosse, dor de estômago, febre, gripe	Alonso-Castro et al. (2012); Juárez-Vázquez et al. (2013).
Namíbia	AIDS, tosse, diarreia, tuberculose	Chinsembu, et al. (2015); Maroyi (2011)

País	Indicações de <i>Psidium guajava</i>	Referência(s)
Nepal	Gastrite, flatulência, pressão arterial	Singh et al. (2011); Thapa (2012)
Nigéria	Hemorroidas, febre, disenteria, diarreia, malária, dor de estômago	Ariwaodo et al. (2012); Maroyi (2011)
Paquistão	Diarreia, tosse, dor de estômago e disenteria, dores de dente, indigestão, prisão de ventre	Khan et al. (2013)
Papua Nova Guiné	Catapora, sarampo, intoxicação alcoólica, rinite	Waruruai et al (2011)
Peru	Diarreia, disenteria	Sanz-Biset et al. (2009)
Filipinas	Diarréia, cortes, feridas	Abe and Ohtani (2013); Tantiado (2012)
África do Sul	Candidíase vaginal, AIDS, gonorreia, doenças venéreas não especificadas, infecções respiratórias	Maroyi (2011); Otang et al. (2012), Van-Vuuren and Naidoo (2010); York et al. (2011)
Tanzânia	Tuberculose	Maroyi (2011)
Tailândia	Diarreia	Srithi et al. (2009)
Togo	Diabetes	Holaly et al. (2015)
Uganda	AIDS, tosse, diarreia, tuberculose	Asiimwe et al. (2013); Maroyi (2011)
Vanuatu	Diarreia, disenteria	Bradacs et al. (2011)
Zimbábue	Tosse, gripe, febre	Maroyi (2011)

Tabela 2.Uso de *Psidium guajava* no tratamento de sinais e sintomas relacionados a doenças infecciosas e parasitárias (continua)

Agente etiológico	Indicações de <i>P. guajava</i> na medicina popular	Formas de uso	Parte (s) usada(s)	Referência(s)
<i>Protozoa</i>				
Amebíase	Dor de estômago, flatulência, febre, diarreia.	Infusão, decocção	Folhas, raízes, casca de caule.	Semenya e Maroyi (2012), Alonso-Castro et al. (2012), Rishika e Sharma (2012), Juárez-Vázquez et al. (2013).
Giardíase	Dor de estômago, diarreia.	Infusão, decocção	Folhas, raízes, casca de caule.	Semenya and Maroyi (2012), Alonso-Castro et al. (2012), Rishika and Sharma (2012), Juárez-Vázquez et al. (2013), Neiva et al. (2014).
Leishmaníase	Ferida, febre, dor, problemas respiratórios, diarreia, sangramento.	Infusão, decocção	Folhas, raízes, casca de caule.	Andrade-Cetto (2009), Semenya e Maroyi (2012), Alonso-Castro et al. (2012), Rishika e Sharma (2012).
Malária	Febre, dor.	Infusão, decocção	Folhas, raízes, casca de caule.	Ariwaodo et al. (2012), Juárez-Vázquez et al. (2013).
Tricomoniase	Corrimento vaginal, prurido.	Infusão	Folhas, raízes.	Van Vuuren e Naidoo (2010).
<i>Fungi</i>				
	Tosse, rinite.	Infusão, decocção	Folhas.	York e Van Vuuren (2011), Juárez-Vázquez et al. (2013).
	Diarréia, problemas digestivos, dor.	Infusão, decocção, gargarejo.	Folhas, raízes, casca de caule.	York e Van Vuuren (2011), Semenya e Maroyi (2012), Alonso-Castro et al. (2012), Rishika e Sharma (2012).
	doenças de pele, coceira, feridas, micoses, aftas.	Infusão, decocção, gargarejo.	Folhas, raízes.	Fenner et al. (2006), Van Vuuren e Naidoo (2010), Andrade-Cetto (2009), Oliveira et al. (2010).
	Corrimento vaginal, doenças venéreas não especificado.	Infusão.	Folhas.	Van Vuuren e Naidoo (2010).
<i>Bacteria</i>				
	Tuberculose.	Decocção, macerado.	Folhas, casca.	Ogbole e Ajaiyeoba (2010), Asimwe et al. (2013).
	Cólera.	Decocção.	Folhas.	Sahu et al. 2014.
	Gonorreia, doenças venéreas não	Infusão.	Folhas, raízes.	Van Vuuren e Naidoo (2010).

Agente etiológico	Indicações de <i>P. guajava</i> na medicina popular	Formas de uso	Parte (s) usada(s)	Referência(s)
	especificadas, corrimento vaginal. problemas urinários.	Infusão.	Folhas e raízes.	Van Vuuren e Naidoo (2010).
	Problemas pulmonares, distúrbios respiratórios, tosse, rinite, catarro, febre, dor de garganta.	Infusão, decocção, gargarejo.	Folhas, raízes, casca de caule.	York e Van Vuuren (2011), Alonso-Castro et al. (2012).
	Dor de dente.	Infusão, decocção.	Folhas.	Alonso-Castro et al. (2012), Khan et al. (2013).
	Diarreia, disenteria, problemas digestivos, constipação.	Infusão, decocção.	Folhas, raízes, casca de caule, fruto.	Alonso-Castro et al. (2012), Semanya e Maroyi (2012), Rishika e Sharma (2012).
	Dor de estômago, gastrite, úlcera.	Infusão, decocção.	Folhas, raízes, casca de caule.	Andrade-Cetto (2009), Alonso-Castro et al. (2012), Rishika e Sharma (2012), Khan et al. (2013).
	Furúnculos, feridas na pele, infecções.	Infusão, decocção, cataplasma.	Folhas.	Alonso-Castro et al. (2012), Otang et al. (2012).
Virus	Diarreia, dor.	Infusão, decocção.	Folhas, raízes, casca de caule.	Semanya and Maroyi (2012), Rishika e Sharma (2012), Juárez-Vázquez et al. (2013).
	Gripe, rinite, resfriados, tosse, febre.	Infusão, decocção, gargarejo.	Folhas.	Andrade-Cetto (2009), Alonso-Castro et al. (2012), York e Van Vuuren (2011).
	Herpes	Infusão	Folhas.	Alonso-Castro et al. (2012).
	AIDS	Decocção	Folhas, casca de caule..	Lamorde et al. (2010), Chinsebu et al. (2015).

Table 3.

Validação científica do efeito de *Psidium guajava* contra micro-organismos patogênicos

(continua)

Grupo microbiano	Parte(s) usada(s)	Extrato/Fração/Composto(s)	Micro-organismo(s)	Validação científica
Protozoários	Casca de caule, folha, raiz, flor, fruto.	Extrato aquoso (decoção e infusão), extrato hidrometanólico (80%), extrato hidroetanólico (maceração e percolação), extrato etanólico, extrato diclorometano, extrato ciclo-hexano, extrato ciclo-hexano + cloroquina, extrato éter de petróleo, extrato acetato de etila, extrato metanólico.	<i>Entamoeba histolytica</i> , <i>Giardia lamblia</i> , <i>Leishmania donovani</i> , <i>Plasmodium falciparum</i> , <i>Plasmodium berghei</i> , <i>Trichomonas vaginalis</i>	Birdi et al. (2011); Chenniappan e Kadarkarai (2010); Chinchila et al. (2011 and 2012); Gachet et al. (2010); Gawad et al. (2015); Inyang-Etoh e Ohanu, (2015); Kaushik et al. (2015); Melariri et al., (2012); Neiva et al. (2014); Rajendran et al. (2014); Tarkang et al. (2014); Van Vuuren e Naidoo (2010); Vera-Ku et al. (2010)
Fungos	Folha	Extrato de hexano, extrato de acetona, extrato aquoso (infusão e decoção), extrato metanólico, fração acetato de etila, extrato hidroetanólico (70%), extrato acetato de etila, extrato éter de petróleo, extrato de tolueno, extrato etanólico (30%).	<i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Microsporium canis</i> , <i>Microsporium gypseum</i> , <i>Trichophyton tonsurans</i> , <i>Trichophyton rubrum</i> , and <i>Sporothrix schenckii</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i> , <i>Epidermophyton floccosum</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Penicillium</i> spp, <i>Microsporium canis</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Candida krusei</i> , <i>Candida neoformans</i> , <i>Candida epicola</i>	Chanda and Kaneria (2011); Chanu et al. (2011); Egharevba et al. (2010); Ferreira et al. (2013); Fonseca e Botelho (2011), Ghosh et al. (2010); Mailoa et al. (2014); Morais-Braga et al. (2015); Padrón-Márquez et al. (2012); Perera et al. (2014); Suwanmanee et al. (2014)
	Folha, casca de caule, fruto.	Extrato metanólico, extrato éter de petróleo, extrato tolueno, extrato acetato de etila, extrato de acetona,	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumonia</i> , <i>Streptococcus pneumonia</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Moraxella</i>	Adesina et al. (2015); Alo et al. (2012); Bai et al. (2014); Birdi et al. (2010); Chanda e Kaneria (2011), Chavan et al.

Grupo microbiano	Parte(s) usada(s)	Extrato/Fração/Composto(s)	Micro-organismo(s)	Validação científica
		extrato aquoso (decoção), extrato etanólico, extrato diclorometano-metanólico, extrato de cloroformio, extrato hidrometanólico. Compostos: 11 hidroxí-35- tricont- penta-triacontanoato, hexaeicosan- 16-ol, tricosan-17-em-5-ol, nonacosan-23-em-3-ol, 3-O-lixose- morina, 3-O-arabinose-morina, quercetina, 3-O-arabinose- quercetina	<i>catarrhalis</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Mycobacterium bovis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella enteric</i> , <i>Vibrio cholera</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>Shigella sp</i> , <i>Lactobacillus sp.</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Pseudomonas fluorescense</i> , <i>Enterobacter sp</i> , <i>Citrobacter sp.</i> , <i>Xanthomonas campestris</i> , <i>Xanthomonas citri</i> , <i>Klebsiella sp.</i> , <i>Shigella flexneri</i> , <i>Helicobacter pylori</i> , <i>Streptococcus sanguinis</i> , <i>Streptococcus mitis</i> , <i>Actinomyces sp.</i> , <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Streptococcus salivarius</i> , <i>Streptococcus mitior</i> , <i>Streptococcus milleri</i> , <i>Oligella ureolytica</i> , <i>Ureaplasma urealyticum</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Gardnerella vaginalis</i>	(2015); Fathilah (2011); Garode e Waghode (2014); Ghosh et al. (2010); Ibekwe et al. (2014); Ifeanyiichukwu et al. (2015); John et al. (2013); Madduluri et al. (2013); Mehta et al., (2012); Philip et al. (2015); Rahim et al. (2010); Rajan et al. (2015); Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn (2010); Uyub et al. (2010); Van Vuuren and Naidoo (2010); Vieira et al. (2014); York et al. (2012).
Virus	Folha	Extrato hidroetanólico (70%), extrato aquoso, extrato etanólico, saponinas	Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) H1N1 virus (A/Narita/1/2009, A/Yamaguchi/20/06 e A/Kitakyushu/10/06 - resistente a Oseltamivir) AS-11 simian rotavirus HIV	Faral-Tello et al. (2012); Juying et al. (2010); Lamorde et al. (2010); Sriwilaijaroen et al. (2012).

References

- Abe, R., Ohtani, K. 2013. An ethnobotanical study of medicinal plants and traditional therapies on Batan Island, the Philippines. *J. Ethnopharmacol.* 145, 554–565.
- Adesina, T.D., Nwinyi, O.C., Olugbuyiro, J.A.O. 2015. Prevention of bacterial biofilms formation on urinary catheter by selected plant extracts. *Pak. J. Biol. Sci.* 18, 67-73.
- Alo, M., Eze, U.A., Anyim, C. 2012. Guajava leaves on *Salmonella typhi* isolates. *Health. Sci.* 1, 1-6.
- Alonso-Castro, A.J., Maldonado-Miranda, J.J., Zarate-Martinez, A., Jacobo-Salcedo, M.R, Fernández-Galicia, C., Figueroa-Zuñiga, L.A., Rios-Reyes, N.A., Leon-Rubio, M.A., Medellín-Castillo, N.A., Reyes-Munguia, A., Méndez-Martínez, R., Carranza-Alvarez, C. 2012. Medicinal plants used in the Huasteca Potosina, Mexico. *J. Ethnopharmacol.* 143, 292-298.
- Alonso-Castro, A.J., Villarreal, M.L., Salazar-Olivo, L.A., Gomez-Sanchez, M., Dominguez, F., Garcia-Carranca, A. 2011. Mexican medicinal plants used for cancer treatment: pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *J. Ethnopharmacol.* 133, 945-972.
- Andrade-Cetto, A. 2009. Ethnobotanical study of the medicinal plants from Tlanchinol, Hidalgo, México. *J. Ethnopharmacol.* 122, 163-171.
- Ariwaodo, J.O., Chukwuma, E.C., Adeniji, K.A. 2012. Some medicinal plant species of Asamagbe Stream Bank Vegetation, Forestry Research Institute of Nigeria, Ibadan. *Ethn. Res. Appl.* 10:541-549.
- Asasea, A., Hessea, D.N., Simmonds, M.S.J. 2012. Uses of multiple plants prescriptions for treatment of malaria by some communities in southern Ghana. *J. Ethnopharmacol.* 144, 448–452.
- Asiimwe, S., Kamatenesi-Mugisha, M., Namutebi, A., Borg-Karlsson, A.K., Musiimenta, P. 2013. Ethnobotanical study of nutri-medicinal plants used for the management of HIV/AIDS opportunistic ailments among the local communities of western Uganda. *J. Ethnopharmacol.* 150, 639-648.
- Bai, S., Bharti, P., Seasotiya, L., Malik, A., Dalal, S. 2014. In vitro screening and evaluation of some Indian medicinal plants for their potential to inhibit Jack bean and bacterial ureases causing urinary infections. *Pharm. Biol.* 53, 326-333.

- Barbalho, S.M., Farinazzi-Machado, F.M.V., Alvares, G.R., Brunnati, A.C.S., Otoboni, A.M. 2012. *Psidium guajava* (Guava): A plant of mul-tipurpose medicinal applications. Med. Aromat. Plants. 1, 2167-2173.
- Beatriz, P.M., Ezequiel, V.V., Azucena, O.C., Pilar, C.R. 2012. Antifungal activity of *Psidium guajava* organic extracts against dermatophytic fungi. J. Med. Plant. Res. 6, 5435-5438.
- Bera, E., Bhattacharya, S., Biswas, M. 2013. Evaluation of acute anti-inflammatory activity of *Psidium guajava* leaf extracts in Wistar albino rats. J. Adv. Pharm. Edu. Res. 3, 23-25.
- Beverly, C.D., Sudarsanam, G. 2011. Ethnomedicinal plant knowledge and practice of people of Javadhu hills in Tamilnadu. Asian Pac. J. Trop. Biomed. 2011, S79-S81.
- Betti, J.L., Caspa, R., Ambara, J., Kourogue, R.L. 2013. Ethno-botanical study of plants used for treating malaria in a forest: savanna margin area, East Region, Cameroon. Global J. Res. Med. Plants Indigen. Med. 2, 692-708.
- Birdi, T.J., Daswani, P.G., Brijesh, S., Tetali, P. 2011. In vitro anti giardial and antirotaviral activity of *Psidium guajava* L. leaves. Indian. J. Pharmacol. 43, 616-617.
- Birdi, T.J., Daswani, P.G., Brijesh, S., Tetali, P., Natu, A., Antia, N. 2010. Newer insights into the mechanism of action of *Psidium guajava* L. leaves in infectious diarrhea. BMC Complement. Altern. Med. 10, 33-43.
- Biswas, B., Rogers, K., McLaughlin, F., Daniels, D., Yadav, A. 2013. Antimicrobial activities of leaf extracts of guava (*Psidium guajava* L.) on two gram-negative and gram-positive bacteria. Int. J. Microbiol. 2013.
- Bjarnason, A., Asgeirsson, H., Baldursson, O., Kristinsson, K.G., Gottfredsson, M. 2015. Mortality in healthcare-associated pneumonia in a low resistance setting: a prospective observational study. Infect. Dis. (Auckl). 47, 130-136.
- Borba, A.M., Macedo, M. 2006. Plantas medicinais usadas para a saúde bucal pela comunidade do bairro Santa Cruz, Chapada dos Guimarães, MT, Brasil. Acta bot. bras. 20, 771-782.
- Bosco, A., Ninsiima, H., Mutanda, J., Musiime, V., Kityo, C., Mpagi, J., Mutumba, G.M., Okello, P., Mutanda, J., Kayiwa, J. 2014. Rotavirus Infection in HIV-1 Infected Individuals at an urban HIV/AIDS Treatment Center in Kampala, Uganda. J. Adv. Biomed. Stud. 1, 008-012.

- Bradacs, G., Heilmann, J., Weckerle, C.S. 2011. Medicinal plant use in Vanuatu: A comparative ethnobotanical study of three islands. *J. Ethnopharmacol.* 137, 434–448.
- Bresee, J.S., Marcus, R., Venezia, R.A., Keene, W.E., Morse, D., Thanassi, M., Brunett, P., Bulens, S., Beard, R.S., Dauphin, L.A., Slutsker, L., Bopp, C., Eberhard, M., Hall, A., Vinje, J., Monroe, S.S., Glass, R.I. 2012. The etiology of severe acute gastroenteritis among adults visiting emergency departments in the United States. *J. Infect. Dis.* 205, 1374-1381.
- Brown, G.D., Denning, D.W., Gow, N.A., Levitz, S.M., Netea, M.G., White, T.C. 2012. Hidden killers: human fungal infections. *Sci. Transl. Med.* 4, 165rv13.
- Buvaneswari, S., Raadha, C.K., Krishnaveni, N., Jayashree, S. 2011. *In-vitro* Antimicrobial activity of *Psidium guajava* against clinically important strains. *E - J. Life. Sci.* 1, 14-22.
- Cates, R.G., Prestwich, B., Innes, A., Rowe, M., Stanley, M., Williams, S., Thompson, A., McDonald, S., Cates, S., Shrestha, G., Soria, J.A.F., Espinoza, L.V., Ardón, G., Galvez, B., Díaz, M.R., Coronado, F.S., García, J.R., Arbizú, D.A., Martinez, J.V. 2013. Evaluation of the activity of Guatemalan medicinal plants against cancer cell lines and microbes. *J. Med. Plant. Res.* 7, 2616-2627.
- Chanda S, Kaneria M. 2011. Indian nutraceutical plant leaves as a potential source of natural antimicrobial agents. In A. MendezVilas (Ed.), *Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*, Formatex Research Center, Spain. 2, 1251-1259.
- Chandekar, C.J., Madhugiri, M.J. 2011. Antimicrobial potential of leaves of *Psidium guajava*. *Bioscan. (Ranchi).* 6, 557-561.
- Chanu, T.R., Pai, V., Chakraborty, R., Bangar, R., Lobo, R., Ballal, M. 2011. Screening for antidiarrheal activity of *Psidium guajava*: A possible alternative in the treatment against diarrhea causing enteric pathogens. *J. Chem. Pharm. Res.* 3, 961-967.
- Chauhan, A.K., Singh, S., Singh, R.P., Singh, S.P. 2015. Guava-enriched dairy products: a review. *Indian. J. Dairy. Sci.* 68, 1-5.
- Chavan, N.S., Phadtare, R.D., Chavan, T.B. 2014. Effect of aqueous extracts of different medicinal plants on control of *Streptococcus mutans*. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 4, 1072-1081.

- Chenniappan, K., Kadarkarai, M. 2010. *In vitro* antimalarial activity of traditionally used Western Ghats plants from India and their interactions with chloroquine against chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*. Parasitol. Res. 107, 1351-1364.
- Chinchilla-Carmona, M., Valerio-Campos, I., Sánchez-Porras, R., Mora-Chaves, V., Bagnarello-Madrigal, V., Martínez-Esquivel, L., González-Paniagua, A., Vanegas, J.C. 2011. Evaluación in vivo de la actividad antimalárica de 25 plantas provenientes de una Reserva de Conservación Biológica de Costa Rica. Rev. Chilena Hist. Nat. 84, 115-123.
- Chinchilla, M., Valerio, I., Sanchez, R., Mora, V., Bagnarello, V., Martinez, L., Gonzalez, A., Vanegas, J.C., Apestegui, A. 2012. *In vitro* antimalarial activity of extracts of some plants from a biological reserve in Costa Rica. Rev. Biol. Trop. 60, 881-891.
- Chinsebu, K.C., Hjarunguru, A., Mbang, A. 2015. Ethnomedicinal plants used by traditional healers in the management of HIV/AIDS opportunistic diseases in Rundu, Kavango East Region, Namibia. S. Afr. J. Bot. 100, 33-42
- Choi, J.H., Park, B.H., Kim, H.G., Hwang, Y.P., Han, E.H., Jin, S.W., Seo, J.K., Chung, Y.C., Jeong, H.G. 2012. Inhibitory effect of *Psidium guajava* water extract in the development of 2, 4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis in NC/Nga mice. Food. Chem. Toxicol. 50, 2923-2929.
- Cnops, J., Magez, S., De Trez, C. 2015. Escape mechanisms of African trypanosomes: why trypanosomiasis is keeping us awake. Parasitol. 142, 417-427.
- Dakappa-Shruthi, S., Adhikari, R., Timilsina, S.S., Sajjekhan, S.S. 2013. A review on the medicinal plant *Psidium guajava* L. (Myrtaceae). J. Drug. Deliv. Ther. 3, 162-168.
- Das, S., Choudhury, M.D. 2010. Plants Used Against Gastro-Intestinal Disorders and As Anti Hemorrhagic by Three Tribes of North Tripura District, Tripura, India: A Report. Ethnobot. Leaflets. 14, 467-78.
- Dey, S.K., Jee, D.B., Chattopadhyay, S. Karmakar, K.B. Antimicrobial activities of some medicinal plants of west Bengal. Int. J. of Pharma Bio Sci. 1.
- Dutta, S., Das, S. 2010. A study of the anti-inflammatory effect of the leaves of *Psidium guajava* L. on experimental animal models. Pharmacognosy. Res. 2, 521-527.
- Egharevba, H.O., Iliya, I., Ibekwe, N., Abdullahi, M.S., Okwute, S.K., Okogun, J.I. 2010. Broad spectrum antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. Leaf. Nature. Sci. 8, 43-50.
- Faral-Tello, P., Mirazo, S., Dutra, C., Pérez, A., Geis-Asteggiant, L., Frabasile, S., Koncke, E., Davyt, D., Cavallaro, L., Heinzen, H., Arbiza, J. 2012. Cytotoxic, virucidal, and antiviral activity of South American plant and algae extracts. Scientific. World. J. 2012.

- Fathilah, A. R. 2011. *Piper betle* L. and *Psidium guajava* L. in oral health maintenance. J. Med. Plants Res. 5, 156-163.
- Fenner, R., Betti, A.H., Mentz, L.A., Rates, S.M.K. 2006. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. Braz. J. Pharm. Sci. 42, 369-394.
- Fernandes, K.P.S., Bussadori, S.K., Marques, M.M., Yamashita, N.S., Wadt, E.B., Martins, M.D. 2010. Healing and cytotoxic effects of *Psidium guajava* (Myrtaceae) leaf extracts. Braz. J. Oral. Sci. 9, 449-454.
- Ferreira, M.R.A., Santiago, R.R., Langassner, S.Z., Mello, J.C.P., Svidzinsk, T.I.E., Soares, L.A.L. 2013. Antifungal activity of medicinal plants from Northeastern Brazil. J. Med. Plant. Res. 7, 3008-3013.
- Filho, R.B. 2010. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. Quim. Nova. 33, 229-239.
- Gachet, M.S., Lecaro, J.S., Kaiser, M., Brun, R., Navarrete, H., Muñoz, R.A., Baeur, R., Schühly, W. 2010. Assessment of anti-protozoal activity of plants traditionally used in Ecuador in the treatment of leishmaniasis. J. Ethnopharmacol. 128, 184-197.
- Garode, A.M., Waghode, S.M., 2014. Antibacterial activity of *Psidium guajava* Linn (guava) leaves extracts on bacterial pathogens. Int. J. Bioassays. 3, 1794-1796.
- Gawad, S.M.A., Hetta, M.H., Ross, S.A., Badria, F.A.E.R. 2015. Antiprotozoal and antimicrobial activity of selected medicinal plants growing in Upper Egypt, beni-suef region. World. J. Pharm. Pharm. Sci. 4, 1720-1724.
- Ghosh, P.; Mandal, A., Chakraborty, P.; Rasul, M.G.; Chakraborty, M., Saha, A. 2010. Triterpenoids from *Psidium guajava* with Biocidal Activity. Indian J. Pharm. Sci. 72, 504–507.
- Gómez-Estrada, H., Díaz-Castillo, F., Franco-Ospina, L., Mercado-Camargo, J., Guzmán-Ledezma, J., Medina, J. D., Gaitán-Ibarra, R. 2011. Folk medicine in the northern coast of Colombia: an overview. J. Ethnobiol. Ethnomed. 7, 1-11.
- Ghorbani, A., Langenberger, G., Feng, L., Sauerborn, J. 2011. Ethnobotanical study of medicinal plants utilised by Hani ethnicity in Naban River Watershed National Nature Reserve, Yunnan, China. J. Ethnopharmacol. 134, 651–667.
- Gupta, G.K., Chahal, J., Arora, D. 2011. *Psidium guajava* Linn: Current research and future prospects. J. Pharm. Res. 4, 42-46.
- Gutiérrez, R.M.P., Mitchell, S., Solis, R.V. 2008. *Psidium guajava*: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. J. Ethnopharmacol. 117, 1-27.

- Hajdu, Z., Hohmann, J. 2012. An ethnopharmacological survey of the traditional medicine utilized in the community of Porvenir, Bajo Paragua Indian Reservation, Bolivia. *J. Ethnopharmacol.* 139, 838– 857.
- Holaly, G.E., Simplicio, K.D., Charlemagne, G., Kodjovi, A., Kokou, A., Tchadjobo, T., Amegnona, A., Komlan, B., Jacques, S. 2015. *Pan. Afr. Med. J.* 20.
- Ibekwe, N.N., Nvau, J.B., Oladosu, P.O., Usman, A.M., Ibrahim, K., Boshoff, H.I., Dowd, S.C., Orisadipe, A.T., Aiyelaagbe, O., Adesomoju, A.A., Barry III, C.E., Okogun, J.I. 2014. Some Nigerian anti-tuberculosis ethnomedicines: A preliminary efficacy assessment. *J. Ethnopharmacol.* 155, 524-532.
- Ifeanyichukwu, I., Chika, E., Emmanuel, N., Anthonia, O., Ngozi, A., Agabus, N. 2015. Preliminary investigation of the antibacterial activity of *Psidium guajava* extracts. *European. J. Med. Plants.* 7, 26.
- Inyang-Etoh, P.C., Ohanu, E.C. 2015. The efficacy of plant extracts on caecal amoebiasis in rats. *Veterinary. Sci. Dev.* 5, 41-46.
- Jebashree, H.S., Kingsley, S.J., Sathish, E.S., Devapriya, D. 2011. Antimicrobial activity of few medicinal plants against clinically isolated human cariogenic pathogens - An *in vitro* study. *ISRN. Dent.* 2011.
- John, N.R., Gala, V.C., Sawant, C.S. 2013. Inhibitory effects of plant extracts on multi-species dental biofilm formation *in-vitro*. *Int. J. Pharm. Bio. Sci.* 4, 487-495.
- Jones, N.P., Arnason, J.T., Abou-Zaid, M., Akpagana, K., Sanchez-Vindas, P., Smith, M.L. 2009. Antifungal activity of extracts from medicinal plants used by First Nations Peoples of eastern Canada. *J. Ethnopharmacol.* 73, 191–198.
- Joseph, B., Priya, R.M. 2010. *In vitro* antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. leaf essential oil and extracts using agar well diffusion method. *Int. J. Curr. Pharm. Res.* 2, 28-32.
- Joseph, B., Priya M. 2011. Review on nutritional, medicinal and pharmacological properties of guava (*Psidium guajava* L.). *Int. J. Pharma. Bio. Sci.* 2, 53-69.
- Juárez-Vázquez, M.C., Carranza-Álvarez, C., Alonso-Castro, A.J., González-Alcaraz, V.F., Bravo-Acevedo, E., Chamarro-Tinajero, F.J., Solano, E. 2013. Ethnobotany of medicinal plants used in Xalpatlahuac, Guerrero, Mexico. *J. Ethnopharmacol.* 148, 521-527.

- Juying, Z., Chengyu, L., Quansheng, Y., Yuneng, L. 2010. Clinical curative effect observation of folium *Psidii guajavae* on children with rotavirus enteritis. *Mod. J. Int. Trad. Chin. Western Med.* 2, 5.
- Kadir, M.F., Sayeed, M.S.B., Mia, M.M.K. 2012. Ethnopharmacological survey of medicinal plants used by traditional healers in Bangladesh for gastrointestinal disorders. *J. Ethnopharmacol.* 147, 148–156.
- Kaushik, N.K., Bagavan, A., Rahuman, A.A., Zahir, A.A., Kamaraj, C., Elango, Jasaseelan, C., Kirthi, A.A., Santhoshumar, T., Marimuthu, S., Tiwari, S.K.G., Sahal, D. 2015. Evaluation of antiplasmodial activity of medicinal plants from North Indian Buchpora and South Indian Eastern Ghats. *Malar. J.* 14, 65-73.
- Khan, R.U., Mehmood, S., Jaffar, S.U.K.F. 2013. Ethnobotanical study of food value flora of district Bannu Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. *J. Med. Plants Stud.* 1, 93-105.
- Khisha, T., Karim, R., Chowdhury, S.R., Banoo, R. 2012. Ethnomedical studies of Chakma Communities of Chittagong Hill Tracts, Bangladesh. *Bangladesh Pharm. J.* 15, 59-67.
- Kidaha, M.L., Alakonya, A.E., Nyende, A.B. 2013. Bioactivity determination of methanol and water extracts for roots and leaves of Kenyan *Psidium guajava* L landraces against pathogenic bacteria. *Springerplus.* 2, 670-677.
- Kisangau, D.P., Lyaruu, H.V.M., Hosea, K.M., Joseph, C.C. 2007. Use of traditional medicines in the management of HIV/AIDS opportunistic infections in Tanzania: a case in the Bukoba rural district. 3.
- Kukreja, B.J., Dodwad, V. 2012. Herbal mouthwashes-A gift of nature. *Int. J. Pharma. Bio. Sci.* 3, 46-52.
- Lamorde, M., Tabuti, J.R., Obua, C., Kukunda-Byobona, C., Lanyero, H., Byakika-Kibwika, P., Bbosa, G.S., Lubega, A., Ogwel-Okeng, J., Ryan, M., Waako, P.J., Merry, C. 2010. Medicinal plants used by traditional medicine practitioners for the treatment of HIV/AIDS and related conditions in Uganda. *J. Ethnopharmacol.* 130, 43-53.
- Laval, P., Rakotoarison, H., Savajol, N., Vanny, T. 2011. The contribution of wild medicinal plants towards poverty alleviation and health improvements: a case study in two villages in Mondulkiri Province, Cambodia. *Cambodian J. Nat. Hist.* 1, 29-39.
- Madduluri, S., Rao, K.B., Sitaram, B. 2013. In vitro evaluation of antibacterial activity of five indigenous plants extracts against five bacteria pathogens of humans. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 5, 679-684.

- Mailoa, M.N., Mahendradatta, M., Laga, A., Djide, N. 2014. Antimicrobial activities of tannins extract from guava leaves (*Psidium guajava* L) on pathogens microbial. Int. J. Sci. Tech. Res. 3, 236-241.
- Mao, Q.C., Zhou, Y.C., Li, R.M., Hu, Y.P., Liu, S.W., Li, X.J. 2010. [Inhibition of HIV-1 mediated cell-cell fusion by saponin fraction from *Psidium guajava* leaf]. J. Chin. Med. Mater. 33, 1751-1754.
- Maroyi, A. 2011. An ethnobotanical survey of medicinal plants used by the people in Nhema communal area, Zimbabwe. J. Ethnopharmacol. 136, 347-354.
- Masadeh, M.M., Alkofahi, A.S., Alzoubi, K.H., Tumah, H.N., Bani-Hani, K., 2014. Antibacterial activity of some medicinal plants grown in Jordan. Pharm. Bio. 52, 566–569.
- Mehta, B.K., Nigam, R., Nigam, V., Singh, A. 2012. Isolation & Antimicrobial Screening of Ten Long Chain Aliphatic Compounds from *Psidium guajava* (Leaves). Asian. J. Plant. Sci. Res. 2, 318-322.
- Melariri, P., Campbell, W., Etusim, P., Smith, P. 2012. In vitro antiplasmodial activities of extracts from five plants used singly and in combination against *Plasmodium falciparum* parasites. J. Med. Plants. Res. 6, 5770-5779.
- Metwally, AM., Omar, AA., Harraz, FM., Sohafy, S. 2010. M. Phytochemical investigation and antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. leaves. Phcog. Mag. 2010, 212-218.
- Mitchell, S.A.; Ahmad, M.H. 2006. A Review of Medicinal Plant Research at the University of the West Indies, Jamaica, 1948-2001. West Indies Med. J. 55, 243-269.
- Mohamad, S., Zin, N.M., Wahab, H.A., Ibrahim, P., Sulaiman, S.F., Zahariluddin, A.S.M., Noor, S. S.M. 2011. Antituberculosis potential of some ethnobotanically selected Malaysian plants. J. Ethnopharmacol. 133, 1021–1026.
- Morais-Braga, M.F.B., Carneiro, J.N.P., Machado, A.J.T., Sales, D.L., Santos, A.T.L., Boligon, A.A., Athayde, M.L., Menezes, I.R.A., Souza, D.S.L, Costa, J.G.M., Coutinho, H.D.M. 2015. Phenolic composition and medicinal usage of *Psidium guajava* Linn.: antifungal activity or inhibition of virulence? Saudi J. Biol. Sci. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.09.028>.
- Moreira, C.P.S., Silva, C.G.S., Almeida, V.L. 2012. Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus. J. Ethnopharmacol. 141, 975-981.

- Mulyoutami, E., Rismawan, R., Joshi, L. 2009. Local knowledge and management of simpukng (forest gardens) among the Dayak people in East Kalimantan, Indonesia. For. Ecol. Manag. 257, 2054–2061.
- Nasri, H., Shirzad, H. 2013. Toxicity and safety of medicinal plants. *J HerbMed Pharmacol.* 2, 21-22.
- Natale, W. 2009. Adubação, nutrição e calagem na goiabeira. Em: Natale, W., Rozane, D.E., Souza, H.A., Amorim, D.A. *Cultura da goiaba do plantio à comercialização.* Jaboticabal: FCAV/Capes/CNPq/FAPESP/Fundunesp/ SBF. 1, 257-280.
- Natale, W., Prado, R.D.M., Rozane, D.E., Romualdo, L.M. 2007. Efeitos da calagem na fertilidade do solo e na nutrição e produtividade da goiabeira. *Rev. Bras. Cienc. Solo.* 31, 1475-1485.
- Natale, W., Rozane, D.E., Parent, L.E., Parent, S.É. 2012. Acidez do solo e calagem em pomares de frutíferas tropicais. *Rev. Bras. Frutic. Jaboticabal – SP.* 34, 1294-1306.
- Neiva, V.D.A., Ribeiro, M.N.S., Nascimento, F.R.F., Cartágenes, M.S.S., Coutinho-Moraes, D.F., Amaral, F.M.M. 2014. Plant species used in giardiasis treatment: ethnopharmacology and in vitro evaluation of anti-*Giardia* activity. *Rev. Bras. Farmacogn.* 24, 215-224.
- Njoroge, G.N., Kibunga, J.W. 2007. Herbal medicine acceptance, sources and utilization for diarrhea management in a cosmopolitan urban area (Thika, Kenya). *Afr. J. Ecol.* 45, 65–70.
- Njume, C., Goduka, N.I. 2012. Treatment of diarrhea in rural African communities: an overview of measures to maximise the medicinal potentials of indigenous plants. *Int. J. Environ. Res. Public. Health.* 9, 3911-3933.
- Oliveira, D. A., Sobral, M. E. G Duarte, M. G. R., Fonseca, J. F., França-Botelho, A. C. 2010. Atividade antifúngica do extrato de folhas de *Psidium guajava* sobre leveduras do gênero *Candida*. *Rev. Fac. Odontol. P. Alegre.* 51, 24-26.
- Oliveira, E.O.S, Collier, K.F.S., Mota, G.M.F., Ely, B.P., Pereira, F.R. 2010. Plantas medicinais usadas pela comunidade Kalunga do Quilombo do Engenho de Dentro em Cavalcante – Go para tratamento de afecções bucais. *Rev. Cereus.* 4.
- Oliveira, I.P.D., Oliveira, L.C., Moura, C.S.F.T.D., Júnior, A.F.D.L., Rosa, S.R.A.D. 2012. Cultivo da goiabeira: do plantio ao manejo. *Rev Elet Fac. Montes Belos.* 5.
- Ong, H.C., Chua, S., Milow, P. 2011. Ethno-medicinal Plants Used by the Temuan Villagers in Kampung Jeram Kedah, Negeri Sembilan, Malaysia. *Ethno Med.* 5, 95-100.

- Onyekwe, N.G., Ilodigwe, E.E., Ajaghaku, D.L., Esimone, C.O. 2011. Acute and subchronic toxicities of ethanol root extract of *Psidium guajava* (myrtaceae) in experimental animals. *J. Pharm. Biomed. Sci.* 12.
- Otang, W.M., Grierson, D.S., Ndip, R.N. 2012. Ethnobotanical survey of medicinal plants used in the management of opportunistic fungal infections in HIV/AIDS patients in the Amathole District of the Eastern Cape Province, South Africa. *J. Med. Plants Res.* 6, 2071-2080.
- Perera, D.F.T.N., Fernando, K.M.E.P., Wijendra, W.A.S. 2014. Antifungal activity of secondary metabolites present in *Psidium guajava* leaves against dermatophytes. *Vidyodaya J. Sci.* 19.
- Philip, D.C., Kumari, I.R, Lavanya, B. 2015. Phytochemical analysis, antioxidant and antimicrobial activity of white & pink *Psidium guajava* Linnaeus. *Int. J. Curr. Pharm. Res.* 7, 29-31.
- Picking, D.; Delgoda, R.; Younger, N.; Germosén-Robineau, L.; Boulogne, I.; Mitchell, S.A. 2015. TRAMIL ethnomedicinal survey of Jamaica. *J. Ethnopharmacol.* 169, 314-327.
- Rattanachaikunsopon, P., Phumkhachorn, P. 2010. Contents and antibacterial activity of flavonoids extracted from leaves of *Psidium guajava*. *J. Med. Plant. Res.* 4, 393-396.
- Rahim, N., Gomes, D.J., Watanabe, H., Rahman, S.R., Chomvarin, C., Endtz, H.P., Alam, M. 2010. Antibacterial activity of *Psidium guajava* leaf and bark against multidrug-resistant *Vibrio cholerae*: implication for cholera control. *Jpn. J. Infect. Dis.* 63, 271-274.
- Rajan, S., Suvetha, P., Thirunalasundari, T., Jeeva, S. 2015. Anti-enteric bacterial activity of the traditional medicinal plants of Kanyakumari coast, Tamilnadu, India. *J. Coast. Life. Med.* 3, 640-644.
- Rajendran, C., Begam, M., Kumar, D., Baruah, I., Gogoi, H.K., Srivastava, R.B., Veer, V. 2014. Antiplasmodial activity of certain medicinal plants against chloroquine resistant *Plasmodium berghei* infected white albino BALB/c mice. *J. Parasit. Dis.* 38, 148-152.
- Rakotoarivelo, N.H., Rakotoarivony, F., Ramarosandratana, A.V., Jeannoda, V.H., Kuhlman A.R., Randrianasolo, A., Bussmann, R.W. 2015. Medicinal plants used to treat the most frequent diseases encountered in Ambalabe rural community, Eastern Madagascar. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 11.
- Ravi, K., Divyashree, P. 2014. *Psidium guajava*: A review on its potential as an adjunct in treating periodontal disease. *Pharmacogn. Rev.* 8, 96.

- Regassa, R. 2013. Assessment of indigenous knowledge of medicinal plant practice and mode of service delivery in Hawassa city, southern Ethiopia. *J. Med. Plants Res.* 7, 517-535.
- Ribeiro, D.A., Macêdo, D.G.; Oliveira, L.G.S., Saraiva, M.E., Oliveira, S.F., Souza, M.M.A., Menezes, I.R.A. 2014. Potencial terapêutico e uso de plantas medicinais em uma área de Caatinga no estado do Ceará, nordeste do Brasil. *Rev. Bras. Pl. Med.* 16, 912-930.
- Rishika, D., Sharma, R. 2012. An update of pharmacological activity of *Psidium guajava* in the management of various disorders. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 3, 3577-3584.
- Ryu, N.H., Park, K.R., Kim, S.M., Yun, H.M., Nam, D., Lee, S.G., Jang, H.J., Ahn, K.S., Kim, S.H., Shim, B.S., Choi, S.H., Mosaddik, A., Cho, S.K., Ahn, K.S. 2012. A hexane fraction of guava leaves (*Psidium guajava* L.) induces anticancer activity by suppressing AKT/mammalian target of rapamycin/ribosomal p70 S6 kinase in human prostate cancer cells. *J. Med. Food.* 15, 231-241.
- Salazar, D.M., Melgarejo, P., Martínez, R., Martínez, J.J., Hernández, F., Burguera, M. 2006. Phenological stages of the guava tree (*Psidium guajava* L.). *Sci. Hortic.* 108, 157-161.
- Sanda, K.A., Grema, H.A., Geidam, Y.A., Bukar-Kolo, Y.M. 2011. Pharmacological aspects of *Psidium guajava*: An update. *Inter. J. Pharmacol.* 7, 316-324.
- Sanz-Biset, J., Campos-de-la-Cruz, J., Epiquién-Rivera, M.A., Canigueral, S. 2009. A first survey on the medicinal plants of the Chazuta valley (Peruvian Amazon). *J. Ethnopharmacol.* 122, 333-362.
- Sato, R.; Dang, K.M.; McPherson, B.G.; Brown, A.C. 2010. Anticancer Activity of Guava (*Psidium guajava*) Extracts. *J. Complem. Integ. Med.* 7, 43.
- Semenya, S.S., Maroyi, A. 2012. Medicinal plants used by the Bapedi traditional healers to treat diarrhea in the Limpopo Province, South Africa. *J. Ethnopharmacol.* 144, 395-401.
- Siani, A.C., Souza, M.C., Henriques, M.G.M.O., Ramos, M.F.S. 2013. Anti-inflammatory activity of essential oils from *Syzygium cumini* and *Psidium guajava*. *Pharm. Biol.* 51, 881-887.
- Singh, A.G., Gautam, L.P., Tewari, D.D. 2011. Folk Uses of some Medicinal Plants of Dobhan VDC of Palpa District, Western Nepal. *J. Phytol.* 3, 62-67.
- Souza, E. L. 2010. Pneumonias adquiridas na comunidade. *Pediatr. Mod.* 56, 38-46.
- Souza, G.H.B., Mello, J.C.P., Lopes, N.P. 2011. Farmacognosia: Coletânea Científica. UFOP, Ouro Preto.

- Srithi, K., Balslev, H., Wangpakapattanawong, P., Srisangac, P., Trisonthi, C. 2009. Medicinal plant knowledge and its erosion among the Mien (Yao) in northern Thailand. *J. Ethnopharmacol.* 123, 335–342.
- Suwanmanee, S., Kitisin, T., Luplertlop, N. 2014. *In vitro* screening of 10 edible Thai plants for potential antifungal properties. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* 2014.
- Tantiado, R.G. 2012. Survey on Ethnopharmacology of Medicinal Plants in Iloilo, Philippines. *Int. J. Bio-Sci. Bio-Tech.* 4, 11-26.
- Thapa, S. 2012. Medico-ethnobotany of Magar Community in Saliya VDC of Parbat District, Central Nepal. *Our Nature.* 10, 176-190.
- Tarkang, P.A., Okalebo, F.A., Ayong, L.S., Agbor, G.A., Guantai, A.N. 2014. *In Vitro* Antiplasmodial Activities and Synergistic Combinations of Differential Solvent Extracts of the Polyherbal Product, Nefang. *Biomed. Res. Int.* 2014.
- Thakur, N., Vikrant, A. 2014. Preliminary phytochemical analysis of the extracts of *Psidium* Leaves. *Middle. East. J. Sci. Res.* 19, 1421-1424.
- The Plant List. 2016. <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-166741> (accessed 14.02.16).
- Thenmozhi, S., Rajan, S. 2015. GC-MS analysis of bioactive compounds in *Psidium guajava* leaves. *J. Pharmacogn. Phytochem.* 3, 162-166.
- Tong, S.Y., Davis, J.S., Eichenberger, E., Holland, T.L., Fowler, V.G. 2015. *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Clin. Microbiol. Rev.* 28, 603-661.
- Uyub, A.M., Nwachukwu, I.N., Azlan, A.A., Fariza, S.S. 2010. *In-vitro* antibacterial activity and cytotoxicity of selected medicinal plant extracts from Penang Island Malaysia on metronidazole-resistant-*Helicobacter pylori* and some pathogenic bacteria. *Ethnobot. Res. App.* 8, 95-106.
- Van-Vuuren, S.F., Naidoo, D. 2010. An antimicrobial investigation of plants used traditionally in southern Africa to treat sexually transmitted infections. *J. Ethnopharmacol.* 130, 552-558.
- Vieira, D.R., Amaral, F.M., Maciel, M.C., Nascimento, F.R., Libério, S.A., Rodrigues, V.P. 2014. Plant species used in dental diseases: Ethnopharmacology aspects and antimicrobial activity evaluation. *J. Ethnopharmacol.* 155, 1441-1449.

- Volpato, G., Godínez, D., Beyra, A., Barreto, A. 2009. Uses of medicinal plants by Haitian immigrants and their descendants in the Province of Camagüey, Cuba. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 5.
- Waruruai, J., Sipana, B., Koch, M., Barrows, L.R., Matainaho, T.K., Rai, P.P. 2011. An ethnobotanical survey of medicinal plants used in the Siwai and Buin districts of the Autonomous Region of Bougainville. *J Ethnopharmacol.* 138, 564–577.
- York, T., Wet, H., Van-Vuuren, S.F. 2011. Plants used for treating respiratory infections in rural Maputaland, KwaZulu-Natal, South Africa. *J. Ethnopharmacol.* 135, 696-710.
- York, T., Van-Vuuren, S.F., Wet, H. 2012. An antimicrobial evaluation of plants used for the treatment of respiratory infections in rural Maputaland, KwaZulu-Natal, South Africa. *J. Ethnopharmacol.* 144, 118-127.
- Zheng, X., Wei, J. , Sun, W., Li, R., Liu, S., Dai, H. 2013. Ethnobotanical study on medicinal plants around Limu Mountains of Hainan Island, China. *J. Ethnopharmacol.* 48, 64–974.

ARTIGO 2

5 ARTIGO 2: PHENOLIC COMPOSITION AND MEDICINAL USAGE OF *Psidium guajava* L.: ANTIFUNGAL ACTIVITY OR INHIBITION OF VIRULENCE?

Maria F. B. Morais-Braga, Joara N. P. Carneiro, Antonio J. T. Machado, Débora L. Sales,
Antonia T. L. dos Santos, Aline A. Boligon, Margareth L. Athayde, Irwin R. A. Menezes,
Djair S. L. Souza, José G. M. Costa, Henrique D. M. Coutinho.

Artigo aceito no periódico Saudi Journal of Biological Science

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.09.028>

Fator de Impacto: 1.257

(Comprovante de aceite para publicação no anexo A)



Phenolic composition and medicinal usage of *Psidium guajava* L.: antifungal activity or inhibition of virulence?

Maria F. B. Morais-Braga^{a*}, Joara N. P. Carneiro^a, Antonio J. T. Machado^a, Débora L. Sales^a, Antonia T. L. dos Santos^a, Aline A. Boligon^c, Margareth L. Athayde^{c1}, Irwin R. A. Menezes^b, Djair S. L. Souza^d, José G. M. Costa^b, Henrique D. M. Coutinho^b.

^a Department of Biological Sciences, Regional University of Cariri, Crato, Ceará – Brazil; ^b Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, Crato, Ceará – Brazil; ^c Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do sul – Brazil; ^d ESAM, Federal University of the Semi Arid, Mossoró, Rio Grande do Norte – Brazil.

*Corresponding author. Tel.: (55) 88 3102 1212. E-mail address: flavianamoraisb@yahoo.com.br

¹*In memorian.*

Abstract

Psidium guajava is a Myrtaceae plant whose medicinal properties are recognized in several locations. The use of teas and tinctures prepared from their leaves has been used to combat infections caused by fungi of the genus *Candida*. In this study, aqueous extracts of leaves and hydroethanolic were tested to verify the antifungal potential and its chemical composition has been investigated. The microbiological assays were performed by broth microdilution to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and from these the Minimum Fungicidal Concentration was performed (MFC) by subculturing on solid media. A cell viability curve was obtained for demonstration of inhibition of fungal growth of strains of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. Tests to check morphological changes by the action of the extracts were performed in microcultiive cameras depleted environment at concentrations of MIC / 2, MIC and MIC x 2. Extracts analyzed by high performance liquid chromatography demonstrated flavonoids and phenolic acids. The extracts showed fungistatic effect and no fungicide with MIC > 8192 µg /mL, MFC above 8192 µg/mL. The IC₅₀ was calculated ranging from 1803.02 and 5623.41 µg/mL. It has been found that the extracts affect the morphological transition capability, preventing the formation of pseudohyphae and hyphae. Teas and tinctures, therefore, have the potential antifungal, by direct

contact, causing inhibition of fungal multiplication and its virulence factor, the cell dimorphism, preventing tissue invasion. Further studies are needed to elucidate the biochemical pathways and genes assets involved in these processes.

Keywords: Fungistatic effect; inhibition of dimorphism; Tea; Tincture

1. Introduction

Microorganisms of the genus *Candida* can be found naturally composing the microbiota of the human organism inhabiting your gastrointestinal tract and mucous membranes (Lu et al., 2014; Shao et al., 2007). Changes in dynamic of the host organism too favor the proliferation of these fungi and the disturbance caused in homeostasis can lead to a range of infections that range in their level and location and can only be superficial, in skin and mucosal (oral, vaginal candidiasis) or systemic, reaching compromise the life of an individual (Mayer et al., 2013; Sardi et al., 2013).

Usually the infections caused by *Candida* spp. in its magnitude are assigned to the species *Candida albicans*, however, illness caused by *Candida* non-*albicans* (CNAM) had increased incidence over the years and yeasts of *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* and *Candida parapsilosis* have been increasingly identified as human pathogens (Sardi et al., 2013; Silva et al., 2012).

Mechanisms of resistance to commercial drugs developed by these microorganisms have been constantly investigated and reported and the continuous evolution for resistance is extremely worrying considering the limited number of antifungal classes currently available (Maubon et al., 2014; Xie et al., 2014). The search for different therapeutic alternatives is a constant and the use of natural products of plant origin often serves as a reference to the search for active compounds and, in this sense, a ethno directed approach has directed pharmaceutical research (Albuquerque and Hanazaki, 2006), in this case, in order to antifungal discovery potential.

Member of the Myrtaceae, *Psidium guajava* L. species (guava), plant native to tropical America (Okamoto et al., 2009), has its widespread medicinal use among the world's populations. Being a plant of tropical and subtropical regions, can be found on plantations, in backyards of homes, or naturally in other areas, and could even be considered invasive species (Richardson and Rejmánek, 2011).

The medicinal attributes from all parts of the species are spread over several generations and therefore, makes up many lists of ethnobotanical studies, showing great versatility and value in use, being mentioned for the treatment of various types of diseases (Dakappa-Shruthi, et al., 2013; Gutiérrez et al., 2008).

This therapeutic use recorded in different locations includes a significant number of body systems such as disorders of the sensory system: vertigo (Dakappa-Shruthi et al., 2013; Gutiérrez et al., 2008); disorders of the respiratory system: laryngitis, sore throat, colds, coughs, tuberculosis, lung problems, bronchitis, catarrh, rhinitis (Dakappa-Shruthi et al., 2013; Gutiérrez et al., 2008; Ogbole and Ajaiyeoba, 2010; Waruruai et al., 2012); disorders of the genito-urinary system: menstrual disorders, vaginal discharge, childbirth, nephritis, premenstrual syndrome, gonorrhoea, non-specified venereal diseases, leucorrhoea (Dakappa-Shruthi et al., 2013; Gutiérrez et al., 2008; Van Vuuren and Naidoo, 2010); disorders of the nervous system: anorexia, epilepsy, cerebral ailments, chorea, convulsions, nervousness (Dakappa-Shruthi et al., 2013; Gómez-Estrada et al., 2011; Gutiérrez et al., 2008); disorders of the digestive system: diarrhea, dysentery, stomachache, digestive problems, gastric insufficiency, ulcers, dyspepsia, gastroenteritis, gastritis, bowel disorders, colic, toothache, constipation (Dakappa-Shruthi et al., 2013; Gómez-Estrada et al., 2011; Gutiérrez et al., 2008); disorders of the circulatory system: piles, swelling, hypertension, oedema (Dakappa-Shruthi et al., 2013; Gutiérrez et al., 2008); the musculoskeletal system and connective tissue diseases: gout, spasm, rheumatic pain (Dakappa-Shruthi et al., 2013; Gutiérrez et al., 2008); not defined conditions or pain not defined: aches (Dakappa-Shruthi et al., 2013); skin diseases and tissue subcutaneous: inflamed mucous membranes, mouth - swelling, skin problems, ulcers, itch, scabies, skin sores, wounds, dermatosis, sores, boil, gingivitis (Dakappa-Shruthi et al., 2013; Gutiérrez et al., 2008); diseases of the endocrine glands, nutrition and metabolism: diabetes (Gutiérrez et al., 2008); infectious and parasitic diseases: cholera, worms, bacterial infections, herpes, mycoses, thrush, pox, measles (Dakappa-Shruthi et al., 2013; Gutiérrez et al., 2008; Waruruai et al., 2012); neoplasms: cancer (Alonso-Castro et al., 2011), and disease of the blood and blood-forming organs: hemorrhages, blood cleansing (Dakappa-Shruthi et al., 2013; Gutiérrez et al., 2008).

The *P. guajava* popular use in the treatment of infectious diseases, particularly against those caused by fungi, it is common practice registered in different countries such as Brazil, Cuba and South Africa where it is used to treat thrush, leucorrhoea, and vaginitis, pathologies

associated with infections caused by *Candida* spp. (Borba and Macedo, 2006; Fenner et al., 2006; Oliveira et al., 2010; Ramirez et al., 2007; Van Vuuren and Naidoo, 2010).

Considering the pharmacological potential of the species *P. guajava* described in ethnobotanical reports, especially with regard to its therapeutic use in treatments against diseases caused by fungi, this study aims to scientifically validate the antifungal properties of tea and tincture prepared with leaves of guava and evaluate the effect of natural products in virulence strains of *C. albicans* and *C. tropicalis*, particularly its morphological transition process.

2. Material and Methods

2.1. Collection area

The collection was realized in the rainy season at the county of Milagres, Ceará, Northeastern region of Brazil (07° 17.119' S and 038° 51.779' W, 388 m of altitude; 07° 17.120' S and 038° 51.778' W, 389 m of altitude; 07° 17.122' S and 038° 51.776' W, 392 m of altitude; 07° 17.119' S and 038° 51.779' W, 388 m of altitude) at "Sítio" Malhada. The climate is semi-arid, with temperatures ranging between 24° - 26° C (IPECE, 2013).

2.2. Plant material

The study was conducted using young, healthy leaves of a *Psidium* species locally known as red guava, which were collected and transported to the Laboratory of Microbiology and Molecular Biology at the Regional University of Cariri - URCA. Twigs with flowers of the species were also collected and vouchers were produced and deposited in the Herbarium Dárdano de Andrade Lima at the university under No. 10935, where the species was identified as *Psidium guajava* L. The collection period included January, February, March and April, known as the "wintry block of the Cariri Ceara region." Collections were made between 8:30 and 10:30 am, and the plant material was taken to the laboratory where it was subjected to qualitative screening and cleaning before being weighed and stored under refrigeration. Altogether, there were 2650 g of leaves in perfect condition, and this quantity was divided for preparation of three types of extracts: Aqueous Extract of *P. guajava* Infusion

(AEPGI), Aqueous Extract of *P. guajava* Decoction (AEPGD) and: Hydroethanolic Extract of *P. guajava* (HEPG).

2.3. Preparation of extracts

2.3.1. Aqueous extracts

Two types of aqueous extracts were prepared, each using 399.9 g of leaves mixed with 6 L of water (based on a proportion of 10 g/150 mL, equivalent to one cup of tea - 150 cc). The decoction was made by mixing roughly cut leaves in cold water and then boiling for 15 min. Afterwards, the tea was allowed to cool, filtered and then stored under refrigeration. As for the infusion, the water was boiled without leaves, which were placed in the water after turning off the heat. The pot was covered with a lid and allowed to stand until the tea cooled down (Matos, 2002), and the preparation was then filtered and stored under refrigeration both infusion and decoction were frozen (-60 °C) and lyophilized to dryness. The powdered extracts (were stored under refrigeration for testing, using 14.46 g (yield 3.62%) and 15 g (yield 3.75%) extract powder from the decoction and infusion, respectively.

2.3.2. Hydroethanolic extract

The hydroethanolic extract (70%) was prepared by trituration with cold extraction, using a total of 1846.5 g leaves in a proportion of 5 g/mL of hydroethanolic solution (Matos, 2002). The leaves were cut to increase contact surface with the solvent, and the mixture was left at room temperature protected from air and light, for a period of 96 h to for maximum extraction efficiency. The mixture was then filtered and placed in a rotary evaporator (Q-344B - Quimis - Brazil) at 40 rpm and 60 °C to concentrate the extract. Finally, the crude extract was frozen, lyophilized (50.8 g - yield 2.75%) and then stored under refrigeration.

2.4. Chemical analysis

2.4.1. Chemical, apparatus and general procedures

All chemical were of analytical grade. Methanol, acetic acid, gallic acid, caffeic acid and chlorogenic acid were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Quercetin, quercitrin, isoquercitrin, rutin, kaempferol, luteolin, catechin and epicatechin were acquired from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). High performance liquid chromatography (HPLC-

DAD) was performed with a Shimadzu Prominence Auto Sampler (SIL-20A) HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan), equipped with Shimadzu LC-20AT reciprocating pumps connected to a DGU 20A5 degasser with a CBM 20A integrator, SPD-M20A diode array detector and LC solution 1.22 SP1 software.

2.4.2 High performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD)

Reverse phase chromatographic analyses were carried out under gradient conditions using C₁₈ column (4.6 mm x 250 mm) packed with 5 µm diameter particles; the mobile phase was water containing 2% acetic acid (A) and methanol (B), and the composition gradient was: 5% (B) for 2min; 25% (B) until 10 min; 40, 50, 60, 70 and 80% (B) every 10 min; following the method described by Silva et al. (2014) with slight modifications. *P. guajava* extracts (hydroethanolic - EHEPG, infusion - EAIPG and decoction - EADPG) and mobile phase were filtered through 0.45 µm membrane filter (Millipore) and then degassed by ultrasonic bath prior to use, the extracts of *P. guajava* were analyzed at a concentration of 20 mg/mL. The flow rate was 0.6 ml/min and the injection volume was 50 µl. The sample and mobile phase were filtered through 0.45 µm membrane filter (Millipore) and then degassed by ultrasonic bath prior to use. Stock solutions of standards references were prepared in water: methanol (1:1; v/v) at a concentration range of 0.025 – 0.300 mg/ml catechin, epicatechin, quercetin, quercitrin, isoquercitrin, kaempferol, luteolin and rutin, and 0.035 – 0.300 mg/ml for gallic, caffeic and chlorogenic acids. Quantification was carried out by integration of the peaks using the external standard method, at 254 nm for gallic acid, 281 nm for catechin and epicatechin, 327 nm for chlorogenic and caffeic acids, and 366 for quercetin, quercitrin, isoquercitrin, luteolin, kaempferol and rutin. The chromatography peaks were confirmed by comparing its retention time with those of reference standards and by DAD spectra (200 to 500 nm). Calibration curve for gallic acid: $Y = 12673x + 1281.9$ ($r = 0.9998$); caffeic acid: $Y = 12943x + 1191.7$ ($r = 0.9996$); chlorogenic acid: $Y = 12083x + 1327.9$ ($r = 0.9995$); catechin: $Y = 11734x + 1306.8$ ($r = 0.9999$); epicatechin: $Y = 12387x + 1239.1$ ($r = 0.9997$); rutin: $Y = 13752x + 1186.5$ ($r = 0.9991$); quercetin: $Y = 11970x + 1181.7$ ($r = 0.9996$); quercitrin: $Y = 11679x + 1251.7$ ($r = 0.9998$), isoquercitrin: $Y = 13759x + 1251.9$ ($r = 0.9993$), kaempferol: $Y = 12659x + 1172.3$ ($r = 0.9997$) and luteolin: $Y = 12507x + 1341.8$ ($r = 0.9990$). All chromatography operations were carried out at ambient temperature and in triplicate.

2.4.3 Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ)

LOD and LOQ were calculated based on the standard deviation of the responses and the slope using three independent analytical curves, as defined by Kamdem et al. (2013). LOD and LOQ were calculated as 3.3 and 10 σ/S , respectively, where σ is the standard deviation of the response and S is the slope of the calibration curve.

2.5. Antifungal assay

2.5.1. Strains and culture media used

Standard types of strains were obtained from the Culture Collection of Oswaldo Cruz of the Brazilian Institute of Quality Control in Health (INCQS) and clinical isolates of the yeasts *Candida albicans* and *Candida tropicalis* were provided by Dr. Edeltrudes Oliveira Lima (Mycology Laboratory of Paraíba Federal University), namely CA INCQS 40006, CA LM 62, CA LM 77, CA LM 109, CA LM 111, CA LM 122, CT INCQS 40042, CT LM 18, CT LM 20 and CT LM 23. These strains were inoculated into Sabouraud Dextrose Agar (SDA, KASVI) and incubated for 24 h at 37 °C. Afterwards, small aliquots of yeast were transferred to test tubes each containing 3 mL of sterile saline (0.9%). Using the McFarland scale, the concentration of the inoculum was standardized by comparing its turbidity with the 0.5 standard, giving a standard yeast suspension of 1×10^5 cells/mL (NCCLS, 2002). The inocula thus prepared were used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) in Sabouraud Dextrose Broth (SDB, HIMEDIA), double concentrated. Another culture medium was used for analysis of yeast micromorphology. The potato dextrose agar (PDA, DIFCO) was prepared by diluting it more than that recommended by the manufacturer to make it a depleted medium capable of stimulating yeast to produce hyphae. Agar was added to this diluted medium to obtain a solid medium.

2.5.2. Drugs, reagents and preparation of solutions

Dimethyl sulfoxide (DMSO, Merck, Darmstadt, Germany) was used for dilution of the extracts, and the antifungal fluconazole (Capsule - FLUCOMED), diluted in water, was used as the reference drug. The matrix solutions of the extracts were prepared by weighing 0.3 g of each extract and then diluting in 1 mL of DMSO. To obtain the desired concentration for testing, the extracts were further diluted in sterile distilled water so that the concentration of DMSO in the natural product did not exert any activity in the test cells (Stoppa et al., 2009).

2.5.3. Microbiological screening

Microbiological screening was performed to select the yeasts to be used in microbiological testing. The microdilution broth was chosen to perform this procedure, and this was done by determining the MIC (Javadpour et al., 1996), since the plates prepared to carry out this test would be used later in tests to find the minimum fungicidal concentration, besides facilitating the demonstration of cell viability curve and calculating the IC₅₀ of the test products.

2.5.4. Determination of minimum inhibitory concentration (MIC)

This test was performed by the broth microdilution method in 96-well plates. Each well was filled with 100 µL of SDB containing 10% fungal inoculum, and then, 100 µL of the natural product (16384 µg/ml) or fluconazole (antifungal reference) at the same concentration, were added to the first well, followed by twofold serial dilution. The concentrations in the wells ranged from 64 to 8192 µg/mL. The last well contained no extract or drug and served as the normal growth control (Javadpour et al., 1996). Controls for diluent of the products (using saline instead of inoculum) and the sterile medium were also prepared. All tests were performed in triplicate. The plates were incubated at 37 °C for 24 h and afterwards read in an ELISA spectrophotometer (Thermoplate®) at a wavelength of 630 nm. The MIC was defined as “the lower concentration of an antimicrobial agent that inhibits the visible growth of a microorganism in dilution assays” (CLSI, 2002). The results obtained in the ELISA readout were used to construct the cell viability curve and the IC₅₀ of the extracts of *P. guajava*.

2.5.5. Determination of minimum fungicidal concentration (CFM)

For this test, a small sterile rod was placed in each well of the MIC test plate (except for sterility control). After mixing the medium in each well, the rod was taken to a large Petri dish containing SDA, streaking its surface and transferring the solution (medium + inoculum + natural product) for subculture of yeast and checking cell viability. After 24 h incubation, the plates were inspected for any formation of colonies of *Candida* (Ernst et al., 1999, with modifications). The concentration at which there was no growth of fungal colonies was considered the MFC of the natural product.

2.5.6. Effect of natural products on fungal morphology

To determine if the natural product caused any change in fungal morphology, by inhibiting the development of hyphae, sterile micromorphological chamber slides were prepared for

observation of yeasts. Three milliliters of PDA medium depleted by dilution were added to chambers, containing the natural product concentrations MIC/2, MIC and MIC x 2. Aliquots of the inoculi were taken from the petri dishes to make two parallel streaks on the solid medium, which were then covered with a sterile coverslip. The chambers were placed in the incubator for 24 h (37 °C) and inspected under a light microscope using a 40X objective. A camera was attached to the microscope to capture images. A control for yeast growth (hyphae stimulated by depleting medium) was performed, as well as a control with the conventional antifungal fluconazole for comparative purposes and a control with DMSO at 100% and 0.5% (the concentration in the natural products used in the tests). The assays were performed according to Sidrin and Rocha (2010) and Mendes (2011), with some modifications.

2.6. Statistical analysis

The results of the tests were done in triplicate. Data obtained for each sample and concentration were checked for their normal distribution and then analyzed by one-way ANOVA by post hoc Tukey test. EC₅₀ values were obtained by nonlinear regression for the purpose of interpolating values from standard curves (using the software Graphpad Prism, v. 5.0) of the % *growth* values plotted against concentration and EC₅₀ values are expressed as µg/mL.

3. Results and Discussion

The chemical analysis performed to detect the presence of phenolic acids and flavonoids, verifying the predominance of the latter in two extracts. The hydroethanolic extract showed more efficient as extracting agent, since quantity of compounds able to extract higher. To the aqueous extracts, exposure to different temperature times caused no significant difference in the amount of extracted compounds, however the extract obtained from infusion had a greater abundance of flavonoids as compared to the decoction. Studies show that can occur degradation of flavonoids with temperature rise, however, this process also depends on the chemical structure and the interaction between them (Baby et al., 2007; Mello et al., 2010). In this sense, the decoction longer exposure to elevated temperature may have been the cause of the reduction of the level of flavonoids. The major compound differed only in the analysis of each extract into the aqueous infusion made, which in this case is the quercitrin, while the

other the quercitrin appears to be the most expressive content. The chromatogram extracts of the species is shown in Figure 1, and the results representing their chromatographic profiles in front the parameters used are detailed in Table 1.

The chemical composition of *P. guajava* has been widely investigated and studies have reported that plant extracts are constituted alkaloids, triterpenoids, tannins, saponins, glycosides, flavonoids, and phenolic compounds and other compounds (Dakappa-Shruthi et al., 2013; Tambe et al., 2014).

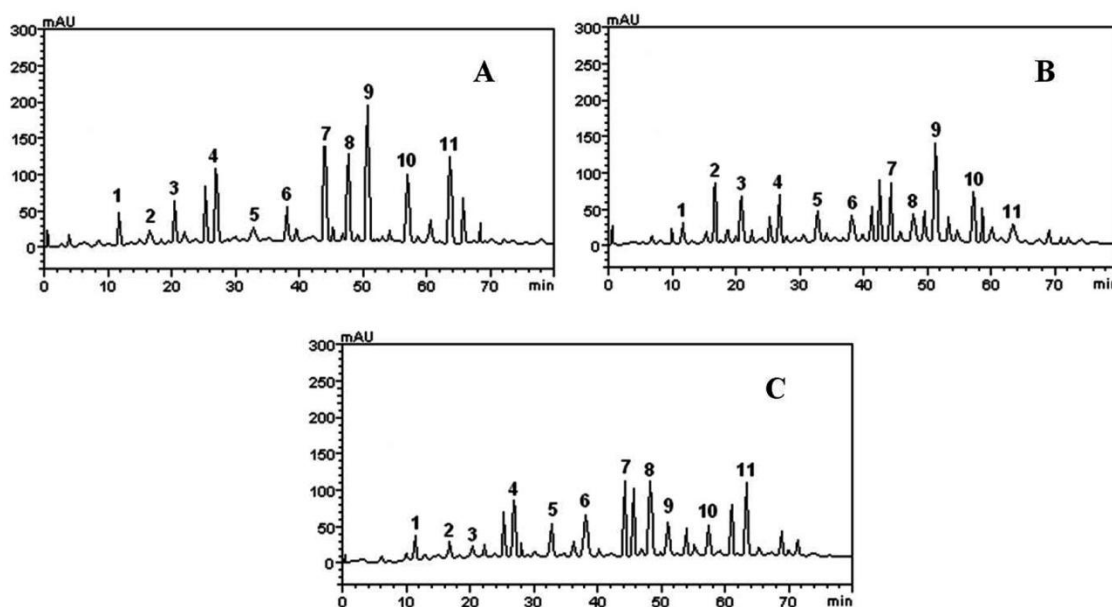


Figure 1 Chromatogram of *Psidium guajava* extracts. High performance liquid chromatography phenolics and flavonoids profile of *Psidium guajava*. A. Hydroethanolic extract of *P. guajava* (HEPG); B. Aqueous extract of *P. guajava* decoction (AEPGD); Aqueous extract of *P. guajava* infusion (AEPGI); Gallic acid (peak 1), catechin (peak 2), chlorogenic acid (peak 3), caffeic acid (peak 4), epicatechin (peak 5), rutin (peak 6), quercitrin (peak 7), isoquercitrin (peak 8), quercetin (peak 9), kaempferol (peak 10) and luteolin (peak 11).

A chemical analysis of tea from the leaves of guava (Chang et al., 2014) highlighted a polyphenol profile in which the main components were found quercetin, myricetins, catechin, gallic and ellagic acids and their derivatives, but the researchers call attention to differences in chemical composition, stating that several factors such as time of collection, form of collection and processing, temperature, among others, may influence the outcome of the chemical prospecting.

The data obtained in microdilution test were used for MIC determination, assembly of cell viability curve and to calculate the IC₅₀ for each product. The same procedure was performed with fluconazole. Cell viability curve of microorganisms in contact with different concentrations of natural products showed a similar behavior in the screening, which allowed

us a random choice of lines for continuity the work. Thus, the standard strains and clinical isolates of *C. albicans* were selected (CA INCQS 40006 e CA LM 77) and *C. tropicalis* (CT INCQS 400042 e CT LM 23). Information is shown in Table 2 and Figure 2. The IC₅₀ of products ranged from 1803.02 to 5623.41 µg/mL and cell viability curve image points the hydroethanolic extract of the species as being the most effective because could reduce a higher percentage of micro-organisms, when compared to the others.

Table 1 Phenolics and flavonoids composition of *Psidium guajava*.

<i>Compounds</i>	<i>P. guajava</i>			<i>LOD</i>	<i>LOQ</i>
	EHPG	AEPGD	AEPGI	µg/mL	µg/mL
	mg/g	mg/g	mg/g		
Gallic acid	3.46 ± 0.01 a	1.57 ± 0.02 a	1.54 ± 0.01 a	0.019	0.062
Catechin	1.57 ± 0.03 b	4.94 ± 0.01 b	1.29 ± 0.02 b	0.008	0.025
Chlorogenic acid	4.39 ± 0.01 c	4.23 ± 0.03 c	1.25 ± 0.03 b	0.024	0.081
Caffeic acid	8.01 ± 0.02 d	4.30 ± 0.01 c	4.73 ± 0.01 c	0.035	0.116
Epicatechin	1.58 ± 0.01 b	3.61 ± 0.02 d	3.58 ± 0.02 d	0.010	0.034
Rutin	3.62 ± 0.01 a	3.52 ± 0.01 d	3.97 ± 0.01 e	0.017	0.056
Quercitrin	11.17 ± 0.03 f	4.95 ± 0.01 b	8.62 ± 0.01 f	0.032	0.105
Isoquercitrin	10.35 ± 0.01 e	3.48 ± 0.03 d	8.59 ± 0.03 f	0.009	0.031
Quercetin	16.81 ± 0.02 g	10.15 ± 0.03 e	3.45 ± 0.03 d	0.025	0.083
Kaempferol	8.26 ± 0.03 d	4.32 ± 0.01 c	3.42 ± 0.01 d	0.018	0.059
Luteolin	10.13 ± 0.01 e	1.69 ± 0.03 a	8.51 ± 0.02 f	0.023	0.075

Results are expressed as mean ± S.E. of three determinations. Averages followed by different letters differ by Tukey test at $p < 0.01$. HEPG: Hydroethanolic Extract of *P. guajava*; AEPGD: Aquous Extract of *P. guajava* Decoction; AEPGI: Aquous Extract of *P. guajava* Infusion; LOD: Limit of detection; LOQ: limit of quantification.

The MIC of the products in this study was determined and standardized as 8192 µg/mL and cell viability curve, the concentration at which it was observed a marked reduction in the percentage of viable microorganisms. The results of Minimum Fungicidal Concentration showed that, the concentrations tested, no extract showed fungicidal effect, since it failed to remove, but reduce the population of microorganisms of *Candida*. We found that the antifungal effect seen is fungistatic and that Minimum Fungicidal Concentration is > 8192 µg/mL.

One of the main virulence factors of *Candida* is the cell dimorphism, which depends on the environmental conditions in which micro-organisms are found growing. This condition dimorphic is characterized by the ability to alter the cellular morphology, alternating, in a reversible manner, between the shape of yeast and hyphae or pseudohyphae, by issuing a structural extension, a filament, passing a state considered dispersive to invasive, respectively, this being a process commonly observed in candidemia systemic, which can be found both morphological types, the yeast and filamentous at the same time (Lu et al., 2014).

Table 2 IC₅₀ (µg/mL) of *Psidium guajava* extracts against *Candida* strains.

Product tested	<i>Candida albicans</i>		<i>Candida tropicalis</i>	
	INCQS 40006	LM 77	INCQS 40042	LM 23
AEPGI	3235.94	3890.45	4570.88	4570.88
AEPGD	4797.33	5623.41	5495.41	5128.61
HEPG	1803.02	1905.46	1862.09	1905.46
Fluconazole	76.72	69.09	73.98	58.63

AEPGI: Aqueous Extract of *P. guajava* Infusion; AEPGD: Aqueous Extract of *P. guajava* Decoction; HEPG: Hydroethanolic Extract of *P. guajava*; INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; LM: Laboratório de Micologia.

Based on the results of the MIC, the tests were performed to verify that the extracts influenced the morphological transition of yeast. To this end we prepared a poor environment in nutrients, where it functioned as stressor of microorganisms, stimulating their potential dimorphic. In carrying out the different tests controls were included, one of the growth control, and demonstrated the feasibility of this morphological transition allowed by the nutrient poor environment where the microculture reveals the presence of pseudohyphae, and hyphae. In another control, DMSO was tested at 100% and the maximum concentration is able to prevent the morphological transition (data not shown). However, to show that the change does not exert dimorphic yeast, the DMSO was assayed in concentration contained in dilution of natural products (0.05%), confirmed that the microculture presented microorganisms in accordance with the growth control. The reference drug, fluconazole, was also evaluated and, as the lowest concentration assayed in the test (MIC / 2), caused inhibition of emission of filamentous structures. The images of the controls are shown in Figure 3.

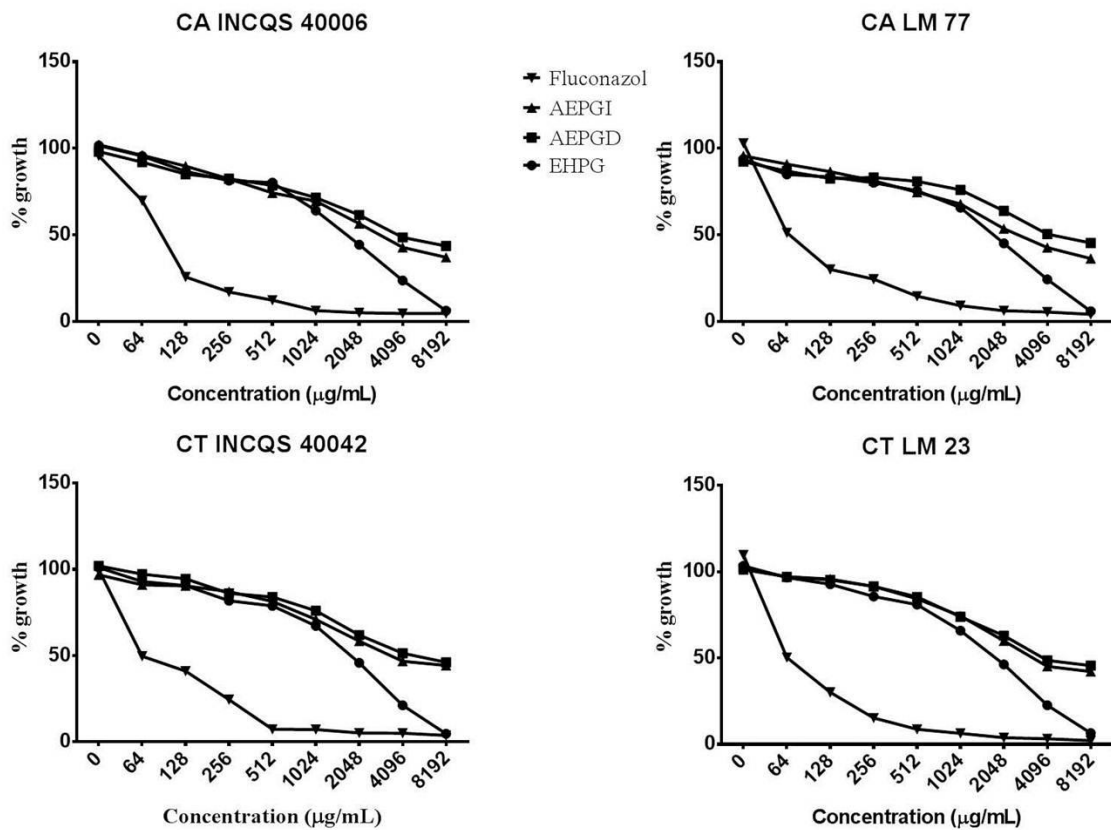


Figure 2 Cell viability curve *Candida* strains under the effect of *Psidium guajava*. CA: *Candida albicans*; CT: *Candida tropicalis*; INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; LM: Laboratório de Micologia; AEPGI: Aqueous Extract of *P. guajava* Infusion; AEPGD: Aqueous Extract of *P. guajava* Decoction; EHPG: Hydroethanolic Extract of *P. guajava*.

The reading of other microcultivations performed with the extracts in concentrations of 4,096, 8,192 and 16,384 µg/mL showed that they were able to affect the phenotypic plasticity of *C. albicans* and *C. tropicalis* reducing hyphae and pseudohyphae formation process in so far as their concentrations were increased. At higher concentration, the yeast form prevailed so that, or not verified the presence of filaments, or these filaments were significantly reduced, as can be seen in Figures 4 and 5.

The guava has been used in Brazil for the treatment of oral diseases, where both the leaves as bark are used in the preparation of tea (for infusion or decoction) to be swallowed or swished still warm, with pretensions to combat thrush and mouth sores, which may be caused by *Candida* strains (Borba and Macedo, 2006; Oliveira et al., 2010). In addition, is no record that various parts of the plant are used not only to treat thrush but also for the treatment of leukorrhea (Fenner et al., 2006), one of the symptoms of vaginal candidiasis. In South Africa the tea from the leaves and roots of guava by infusion is prepared for the treatment of non-specific venereal diseases (Van Vuuren and Naidoo, 2010) and in Cuba, the use of *P. guajava* in folk medicine was also registered against fungi, where parts of the plant are used in the

preparation of dye, powder and elixir (Ramírez et al., 2007). Based on these ethnobotanical reports, we can assume that the main form of therapeutic use *P. guajava* against fungi is the topical use, as the natural product is placed directly on the skin or mucosa, used in mouthwash and gargle, in sitz baths and even in tea administration, which when taken favors the contact of the natural product with the intestinal lumen, where the infection causing microorganisms can be accommodated.

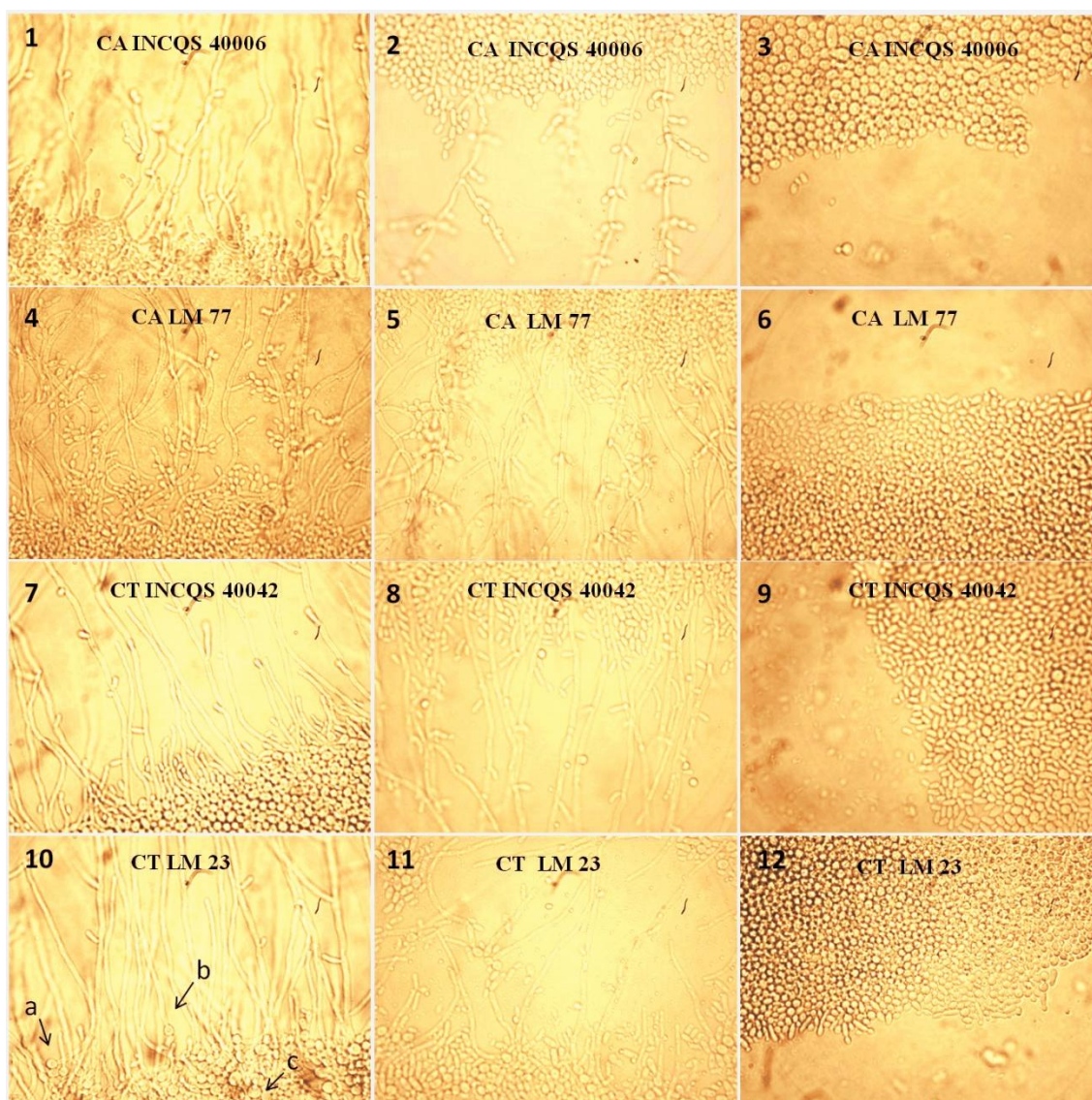


Figure 3 Controls used in micromorphology tests. Cell forms of *Candida*: a: pseudohyphae; b: hyphae; c: yeast; 1, 4, 7 and 10: Growth control; 2, 5, 8 and 11: DMSO 0,05%; 3, 6, 9 and 12: Fluconazole; CA: *Candida albicans*; CT: *Candida tropicalis*; INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; LM: Laboratório de Micologia. Images inspected under a light microscope using a 40X objective.

If we consider the context of this research, a cup of tea (made by decoction and infusion) with 150 ml of water and 10 g of fresh leaves, will be contained in this volume, just

over 4 times the concentration considered as MIC, was able to reduce the percentage of viable microorganisms by direct contact. The same situation is extended to hydroethanolic extract. In 150 ml of tincture is contained 25 times the minimum inhibitory concentration. If relate to the preparation of virulence potential inhibitor in 150 ml of aqueous extracts of plants have about 2 times the concentration at which the filamentous structures of *Candida* have been reduced. In this same volume hydroethanolic extract is contained 12 times the inhibitory concentration dimorphism. Thus a direct contact of tea or tincture prepared in the above relation not only reduce the percentage of viable microorganisms, but also disturb the process of morphological yeast transition that remain in place after the addition of home-made preparations, neutralizing one of its virulence factors the ability to invade substrates.

Due to the etnomedicinal use of *P. guajava* observed both in the traditional medicine as complementary and alternative medicine, the plant is now part of the list of medicinal plants of the World Health Organization (WHO). Based on fundamental criteria such as common use in at least two regions of WHO and satisfactory amount of scientific data, this organization has promoted the development of monographs in which relevant information about this and other species of medicinal relevance, were made available to the public access (WHO, 2009). *P. guajava* also reported in national lists of medicinal plants in some countries and is covered in public policy programs focused on primary health care, as occurs, for example, in Brazil (BRASIL, 2009; RENISUS, 2009).

The belief system of some people, low economic power of users, the medications available at minimal cost, the lack of access to another type of therapeutic resource in conflict areas (especially in poor countries), the fact that they are natural products and considered by some to be more effective than allopathic medicines and cause side effects or milder side effects compared to commercial drugs are some of the reasons given to justify the significant use of medicinal plants (Adnan et al 2014, Khan et al 2014; OMS, 2002), including the species under study.

Regarding the popular therapy with *P. guajava*, several factors can influence the final result of a treatment as a contact time of natural product with the infection microorganisms, duration of treatment, methods of use, among others.

Although we are talking about parts of a plant that has its fruit habitually used in nutrition for human populations from different locations, the use of tea fresh leaves for infusion has had its cytotoxic potential investigated. The aqueous extract intragastric administration in rats of both sexes (doses of 0.2, 2.0 and 20.0 g/day) for prolonged period

(six months) resulted in signs of hepatotoxicity and renal problems as hydronephrosis in males and pyelonephritis, and nephrocalcinosis in females. The LD₅₀ of the extract was more than 20.0 g/kg (Attawish et al., 1995).

Almeida et al. (2006) evaluated in vitro the cytotoxicity of tea made by infusing in peritoneal macrophages of mice. The infusion of the leaves was prepared and tested both immediately as a few hours after preparation. Soon after preparation, the infusion was added to the culture environment which exhibited 10% mortality rate, increasing to 31.82% after storage at 4° C for a period of 48 hours. After this period, the index rose to 76.18% revealing that the infusion, therefore, presents an immunotoxic effect. In this sense, take tea in the same day it is prepared can prevent damage being caused to the cells of the immune system, which, according to the authors, may be due to flavonoids oxidation and subsequent release of their derivatives capable to generate radicals free, which would cause toxicity.

People affected with candidiasis usually present with some impairment of their immune responses and in this sense, would be at serious risk, and may further compromise the body's defenses case, for lack of such risks, adopt an inadequate alternative therapy. These studies therefore point to a cautious use of tea as much as the duration of treatment, preparation and storage even as the administration of excessive amounts.

The antifungal effect of the species *P. guajava* reported here may be due to the presence of phenolic compounds in the extracts, since they are able to promote both inhibition of growth of *Candida* lineages (Alves et al., 2014; Barros et al., 2013; Candiracci et al., 2011; Tempesti et al., 2012; Vashisth et al., 2013; Candiracci et al., 2012), as well as their filamentous structures resulting from the transition process (Candiracci et al., 2012; Canonico et al., 2014). The percentage of phenolic compounds of the hydroethanolic extract was more pronounced compared to aqueous extracts as well as their potential inhibitor, as can be seen in cell viability curve. However, further investigations are needed to elucidate the mechanisms by which act the extracts and which in fact, are the phytochemicals contained therein, responsible for the observed effect.

P. guajava, in subsequent studies, had its antifungal potential investigated obtaining results favorable for different methodologies (Assunccedil et al., 2013; Jebashree et al., 2011; Mailoa et al., 2014; Suwanmanee, et al., 2014), but this was the first report which was investigated and verified its influence on a virulence factor of *Candida*.

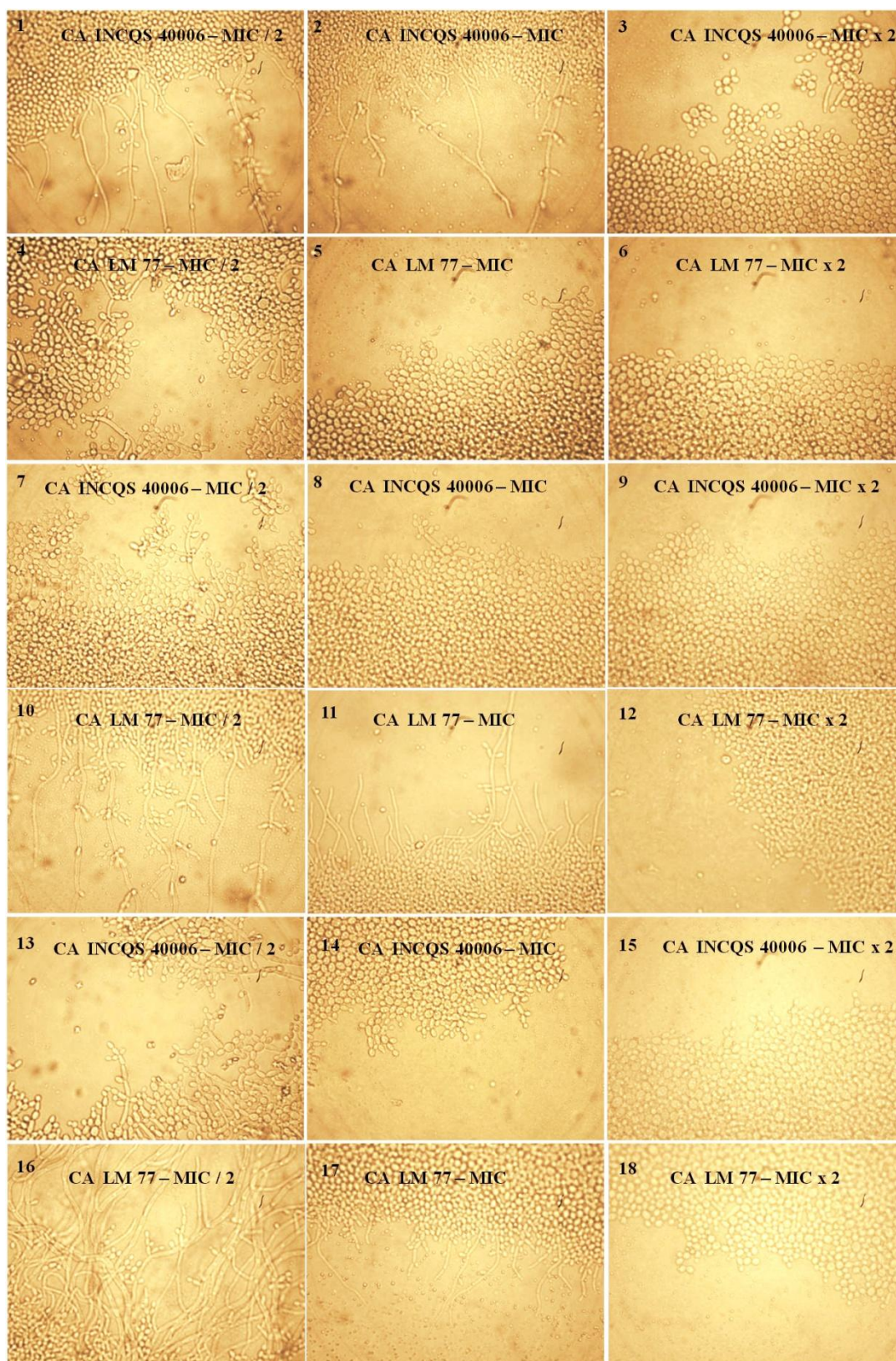


Figure 4 Effect of *Psidium guajava* extracts on the morphology of *Candida albicans*. Concentrations MIC/2, MIC e MIC x 2 (4,096, 8,192 and 16,384 $\mu\text{g/mL}$, respectively). Aquous Extract of *P. guajava* Decoction (AEPGD): 1-6; Aquous Extract of *P. guajava* Infusion (AEPGI): 7-12; Hidroethanolic Extract of *P. guajava* (EHPG): 13-18. INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; LM: Laboratório de Micologia. Images inspected under a light microscope using a 40X objective.

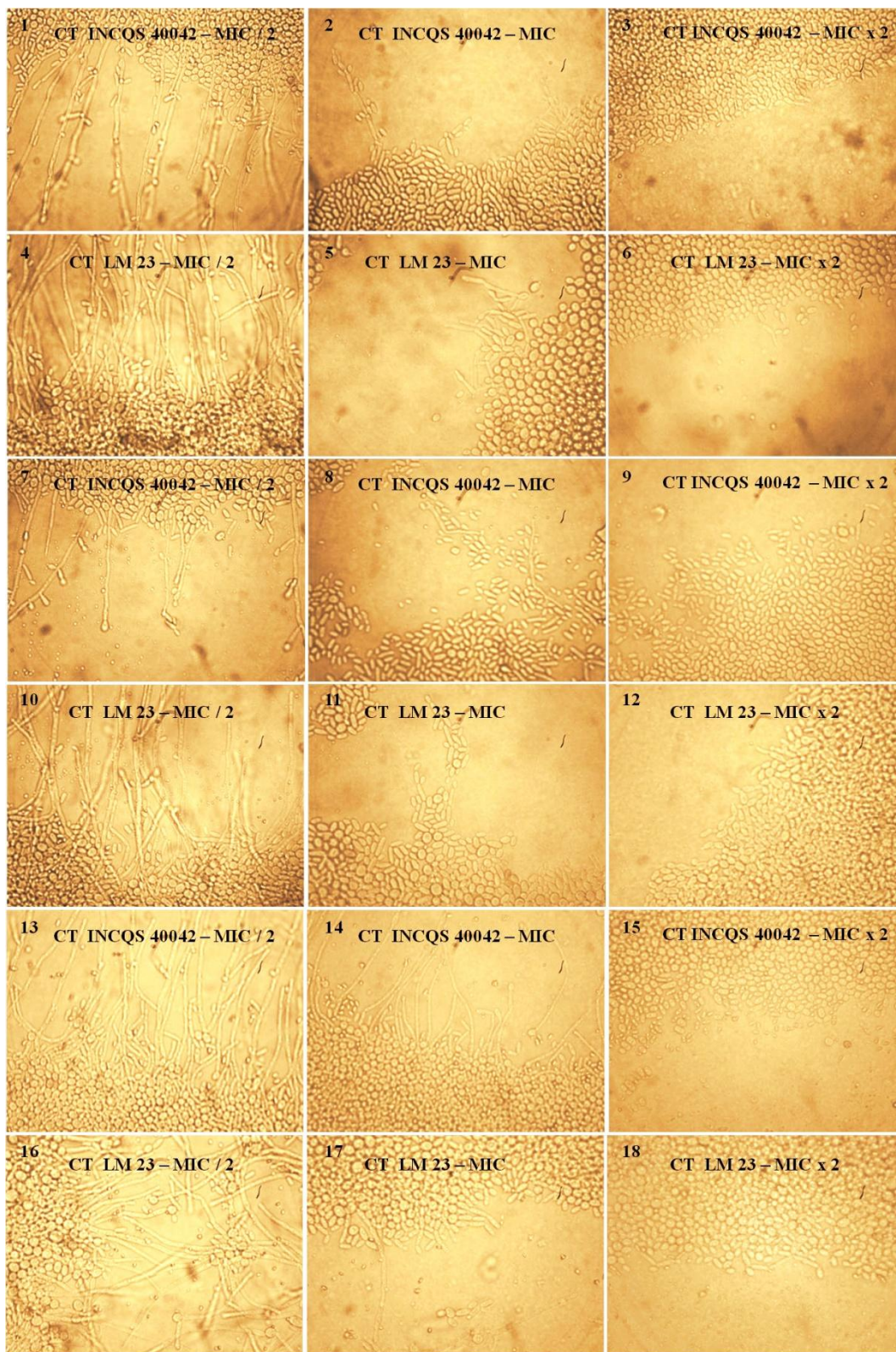


Figure 5 Effect of *Psidium guajava* extracts on the morphology of *Candida tropicalis*. Concentrations MIC/2, MIC e MIC x 2 (4,096, 8,192 and 16,384 $\mu\text{g/mL}$, respectively). Aquous Extract of *P. guajava* Decoction (AEPGD): 1-6; Aquous Extract of *P. guajava* Infusion (AEPGI): 7-12; Hidroethanolic Extract of *P. guajava* (EHPG): 13-18. INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; LM: Laboratório de Micologia. Images inspected under a light microscope using a 40X objective.

4. Conclusion

The use of teas, pastes, plasters and sitz baths prepared from leaves of *P. guajava* (red guava) for different populations had, in this study, their potential bioactive scientifically justified through tests with leaf extracts by direct contact, since, besides provoking a decrease in the population of micro-organisms of the genus *Candida*, affected an important fungal virulence factors, morphological transition, and consequently their invasive potential of tissues. The observed antifungal effect is fungistatic and not fungicidal, since he did not kill the fungi. However, it is important to remember that the existing cultural complex systems in these populations allow different forms of therapeutic preparations with amounts of ingredients that may be different from that used in our tests, it is known that there is no standardization when it comes to the use of plants medicinal. Further studies are needed to understand the genetic and biochemical processes involved in both dynamic fungistatic as in inhibiting emissions of cell extensions of *C. albicans* and *C. tropicalis* in its virulence.

Acknowledgments

The authors are grateful to the Brazilian Research agencies: CNPq, CAPES and FUNCAP by the financial and grant support.

Declaration of interest

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

References

- Adnan, M., Ullah, I., Tariq, A., Murad, W., Azizullah, A., Khan, A., Ali, N. 2014. Ethnomedicine use in the war affected region of northwest Pakistan, .J Ethnobiol Ethnomed, 10, 16.
- Albuquerque, U.P., Hanazaki, N. 2006. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. Rev Bras Farmacogn, 16 (sSupl).
- Almeida, K.C., Barbosa, T.R., Silva, R.N.R., Silva, J. D., Freire, R.B. 2006. Efeito citotóxico do infuso aquoso de *Psidium guajava* L.(Myrtaceae). Rev. Bras. Farm, 87, 60-62.

- Alonso-Castro, A. J., Villarreal, M. L., Salazar-Olivo, L. A., Gomez-Sanchez, M., Dominguez, F., Garcia-Carranca, A. 2011. Mexican medicinal plants used for cancer treatment: pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *J. Ethnopharmacol.*, 133, 945-972.
- Alves, C.T., Ferreira, I.C., Barros, L., Silva, S., Azeredo, J., Henriques, M. 2014. Antifungal activity of phenolic compounds identified in flowers from North Eastern Portugal against *Candida* species. *Future microbiol*, 9, 139-146.
- Assunccedil, M. R., Santiago, R. R., Langassner, S. M. Z., Svidzinski, T. I. E., Soares, L. A. L. 2013. Antifungal activity of medicinal plants from Northeastern Brazil. *J Med Plants Res*, 7, 3008-3013.
- Attawish, A., Chavalittumrong, P., Rugsamon, P., Chuntapet, P. 1995. Toxicity Study of *Psidium guajava* Linn. Leaves. *Bull Dep Med Sci*, 37, 289-305.
- Baby, A.R., Migliato, K.F., Maciel, C.P.M., Zague, V., Pinto, C.A.S.D.O., Salgado, H.R.N., Kaneco, T.M., Velasco, M.V.R. 2007. Accelerated chemical stability data of O/W fluid emulsions containing the extract of *Trichilia catigua* Adr. Juss (and) *Ptychopetalum olacoides* Benth. *Rev Bras Ciên Farm*, 43, 405-412.
- Barros, L., Dueñas, M., Alves, C.T., Silva, S., Henriques, M., Santos-Buelga, C., Ferreira, I.C.F.R. 2013. Antifungal activity and detailed chemical characterization of *Cistus ladanifer* phenolic extracts. *Ind Crops and Prod*, 41, 41-45.
- Borba, A.M., Macedo, M. 2006. Plantas medicinais usadas para a saúde bucal pela comunidade do bairro Santa Cruz, Chapada dos Guimarães, MT, Brasil. *Acta Bot Brasilica*, 20, 771-782.
- Brasil. 2009. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. – Brasília: Ministério da Saúde, 136 p.
- Candiracci, M., Citterio B., Piatti, E. 2012. Antifungal activity of the honey flavonoid extract against *Candida albicans*. *Food Chem*, 131, 493-499.
- Candiracci, M., Citterio, B., Diamantini, G., Blasa, M., Accorsi, A., Piatti, E. 2011. Honey flavonoids, natural antifungal agents against *Candida albicans*. *Int J Food Prop*, 14, 799–808.
- Canonico, B., Candiracci, M., Citterio, B., Curci, R., Squarzone, S., Mazzoni, A., Papa, S., Piatti, E. 2014. Honey flavonoids inhibit *Candida albicans* morphogenesis by affecting DNA behavior and mitochondrial function. *Future microbiol*, 9, 445-456.
- Chang, C.H., Hsieh, C.L., Wang, H.E., Peng, C.C., Chyau, C.C., Peng, R.Y. 2013. Unique bioactive polyphenolic profile of guava (*Psidium guajava*) budding leaf tea is related to plant biochemistry of budding leaves in early dawn. *J sci food agric*, 93, 944-954.
- Dakappa-Shruthi, S., Adhikari, R., Timilsina, S.S., Sajjekhan, S. 2013. A review on the medicinal plant *Psidium guajava* Linn. (Myrtaceae). *J Drug Deliv Ther*, 3, 162-168.
- Ernst, E.J., Klepser, M.E., Ernst, M.E., Messer, S.A., Pfaller, M.A. 1999. *In vitro* pharmacodynamic properties of MK-0991 determined by time-kill methods. *Diagn microbiol infect dis*, 33, 75-80.
- Fenner, R., Betti, A.H., Mentz, L.A., Rates, S.M.K. 2006. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. *Braz J Pharm Sci*, 42, 369-394.

- Gómez-Estrada, H., Díaz-Castillo, F., Franco-Ospina, L., Mercado-Camargo, J., Guzmán-Ledezma, J., Medina, J. D., Gaitán-Ibarra, R. 2011. Folk medicine in the northern coast of Colombia: an overview. *J Ethnobiol Ethnomed*, 7, 1-11.
- Gutiérrez, R.M.P., Mitchell, S., Solis, R.V. 2008. *Psidium guajava*: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *J Ethnopharmacol*, 117, 1-27.
- IPECE. Instituto de Pesquisa e Estratégia Econômica do Ceará. Perfil Básico Municipal: Milagres. Fortaleza, 2013. Available at: http://www.ipece.ce.gov.br/publicacoes/perfil_basico/pbm-2013/Milagres.pdf. Accessed November 10, 2014.
- Javadpour, M.M., Juban, M.M., Lo, W.C., Bishop, S.M., Alberty, J.B., Cowell, S.M., Becker, C.L., McLaughlin, M.L. 1996. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. *J Med Chem*, 39, 107–3113.
- Jebashree, H.S., Kingsley, S.J., Sathish, E.S., Devapriya, D. 2011. Antimicrobial activity of few medicinal plants against clinically isolated human cariogenic pathogens - An *in vitro* study. *ISRN dentistry*, 2011.
- Kamdem, J.P., Olalekan, E.O., Hassan, W., Kade, J., Yetunde, O., Boligon, A.A. 2013. *Trichilia catigua* (Catuaba) bark extract exerts neuroprotection against oxidative stress induced by different neurotoxic agents in rat hippocampal slices. *Ind Crops Prod*, 50, 625- 632.
- Khan, N., Abbasi, A.M., Dastagir, G., Nazir, A., Shah, G.M., Shah, M.M., Shah, M.H. 2014. Ethnobotanical and antimicrobial study of some selected medicinal plants used in Khyber Pakhtunkhwa (KPK) as a potential source to cure infectious diseases. *BMC complement alt med*, 14, 122.
- Lu, Y., Su, C., Liu, H. 2014. *Candida albicans* hyphal initiation and elongation. *Trends microbiol*, 22, 707-714.
- Mailoa, M.N., Mahendradatta, M., Laga, A., Djide, N. 2014. Antimicrobial activities of tannins extract from guava leaves (*Psidium guajava* L.) on pathogens microbial. *Int J Sci Technol*, 3.
- Matos, F.J.A. 2002. *Farmácias vivas*, quarta ed., Fortaleza: Editora UFC, p. 36-40.
- Maubon, D., Garnaud, C., Calandra, T., Sanglard, D., Cornet, M. 2014. Resistance of *Candida* spp. to antifungal drugs in the ICU: where are we now?. *Intensive care med*, 40, 1241-1255.
- Mayer, F.L., Wilson, D., Hube, B. 2013. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4, 119–128.
- Mello, B.C.B.D.S., Petrus, J.C.C., Hubinger, M.D. 2010. Desempenho do processo de concentração de extratos de própolis por nanofiltração. *Food Sci Technol (Campinas)*, 30, 166-172.
- Mendes. J.M. 2011. Investigação da atividade antifúngica do óleo essencial de *Eugenia caryophyllata* Thunb. sobre cepas de *Candida tropicalis*. Dissertação de Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Universidade Federal da Paraíba – UFPB, João Pessoa – PB.
- NCCLS Norma M27-A2. 2002. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade à Terapia Antifúngica das leveduras; Norma Aprovada – Segunda Edição. Norma M27-A2 do NCCLS (ISBN 1-56238-469-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos.
- Ogbole, O., Ajaiyeoba, E. 2010. Traditional management of tuberculosis in Ogun State of Nigeria: the practice and ethnobotanical survey. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med*, 7.
- Okamoto, M.K.H., Kato, E.T.M., Bacchi, E.M. 2009. Morfoanatomia de folhas de *Psidium guajava* L. (Myrtaceae). *Lat Am J Pharm*. 28, 599-603.

- Oliveira, E.O.S, Collier, K.F.S., Mota, G.M.F., Ely, B.P., Pereira, F.R. 2010. Plantas medicinais usadas pela comunidade Kalunga do Quilombo do Engenho de Dentro em Cavalcante – Go para tratamento de afecções bucais. *Rev Cereus*, 4.
- OMS. Organización Mundial de la Salud Ginebra. 2002. "Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005." Available at http://whqlibdoc.who.int/hq/2002/WHO_EDM_TRM_2002.1_spa.pdf Accessed January 5, 2015.
- Quiroga, R., Meneses, L., Bussmann, R.W. 2012. Medicinal ethnobotany in Huacareta (Chuquisaca, Bolivia). *J Ethnobiol Ethnomed*, 29.
- Ramírez, M.G., Ramirez, D., Jacobo, O.L. 2007. Antecedentes y situación reguladora de la medicina herbaria en Cuba. *Bol Latinoam Caribe*, 6, 118-124.
- RENISUS.2009. Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. Available at <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/07/renisus.pdf> Accessed December 2, 2014.
- Richardson, D. M., Rejmánek, M. 2011. Trees and shrubs as invasive alien species—a global review. *Divers Distrib*, 17, 788-809.
- Sardi, J.C.O., Scorzoni, L., Bernardi, T., Fusco-Almeida, A.M., Giannini, M.M. 2013. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol*, 62, 10-24.
- Shao, L.C., Sheng, C.Q., Zhang, W.N. 2007. Recent advances in the study of antifungal lead compounds with new chemical scaffolds. *Yao xue xue bao= Acta pharmaceutica Sinica*, 42, 1129-1136.
- Sidrin, J.J.C., Rocha, M.F.G. 2010. *Micologia médica à luz de autores contemporâneos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 388.
- Silva, A.R.H., Moreira, L.R., Brum, E.S., Freitas, M.L., Boligon, A.A., Margareth, L.A, Roman, S.S., Mazzanti, C.M., Brandão, R. 2014. Biochemical and hematological effects of acute and sub-acute administration to ethyl acetate fraction from the stem bark *Scutia buxifolia* Reissek in mice. *J Ethnopharmacol*, 153, 908-916.
- Silva, S., Negri, M., Henriques, M., Oliveira, R., Williams, D.W., Azeredo, J. 2012. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS microbiol rev*, 36, 288-305.
- Stoppa, M.A., Casemiro, L.A., Vinholis, A.H.C. Cunha, W.R.; Silva, M.L.A.; Martins, C.H.G.; Furtado, N.A.J.C. 2009. Estudo comparativo entre as metodologias preconizadas pelo CLSI e pelo EUCAST para avaliação da atividade antifúngica. *Quím. Nova [online]*, 2009, 498-502.
- Suwanmanee, S., Kitisin, T., Luplertlop, N. 2014. *In vitro* screening of 10 edible thai plants for potential antifungal properties. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014.
- Tambe, R., Singhal, R.G., Bhise, K., Kulkarni, M. 2014. Phytochemical screening and HPTLC fingerprinting of leaf extracts of *Psidium guajava* Linn. *J Pharmacogn Phytochem*, 3, 52-56.
- Tempesti, T.C., Alvarez, M.G., Araújo, M.F., Júnior, F.E.A.C., Carvalho, M.G., Durantini, E.N. 2012. Antifungal activity of a novel quercetin derivative bearing a trifluoromethyl group on *Candida albicans*. *Med Chem Res*, 21, 2217-2222.
- Van Vuuren, S.F., Naidoo, D. 2010. An antimicrobial investigation of plants used traditionally in southern Africa to treat sexually transmitted infections. *J ethnopharmacol*. 130, 552-558.

- Vashisth, P., Nikhil, K., Pemmaraju, S.C., Pruthi, P.A., Mallick, V., Singh, H., Patel A., Mishra, N.C., Singh, R.P., Pruthi, V. 2013. Antibiofilm activity of quercetin-encapsulated cytocompatible nanofibers against *Candida albicans*. *J Bioact Compat Polym*, 28, 652-665.
- Waruruai, J., Sipana, B., Koch, M., Barrows, L.R., Matainaho, T.K., Rai, P.P. 2011. An ethnobotanical survey of medicinal plants used in the Siwai and Buin districts of the Autonomous Region of Bougainville. *J Ethnopharmacol*, 138, 564-577.
- World Health Organization. 2009. WHO monographs on selected medicinal plants Vol IV. World Health Organization, Geneva.
- Xie, J.L., Polvi, E.J., Shekhar-Guturja, T., Cowen, L.E. 2014. Elucidating drug resistance in human fungal pathogens. *Future microbiol*, 9, 523-542.

ARTIGO 3

6 ARTIGO 3: HPLC-DAD, FUNGISTATIC AND ANTI-MORPHOGENICAL ANALYSIS OF EXTRACTS FROM *Psidium brownianum* MART. EX DC. AGAINST YEASTS OF THE GENUS *Candida*

Running title: *Psidium brownianum* Mart. ex DC.

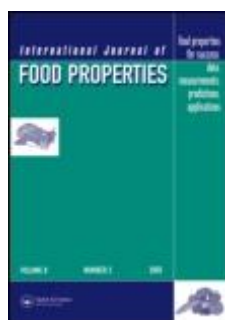
Maria Flaviana B. Morais-Braga, Joara N. P. Carneiro, Antonio J. T. Machado, Débora L. Sales, Dara I. V. Brito, Rosimeire S. Albuquerque, Aline A. Boligon, Margareth L. Athayde, João T. Calixto Júnior, Djair S. L. Souza, Edeltrudes Oliveira Lima, Irwin R. A. Menezes, José G. M. Costa, Felipe S. Ferreira, Henrique D. M. Coutinho.

Artigo publicado on line no periódico International Journal of Food Properties

DOI: 10.1080/10942912.2015.1079786.

Fator de Impacto: 0.915

(Comprovante de aceite para publicação no anexo B)



HPLC-DAD, fungistatic and anti-morphogenical analysis of extracts from *Psidium brownianum* Mart. ex DC. against yeasts of the genus *Candida*

Running title: *Psidium brownianum* Mart. ex DC.

Maria Flaviana B. Morais-Braga^{a*}, Joara N. P. Carneiro^a, Antonio J. T. Machado^a, Débora L. Sales^a, Dara I. V. Brito^b, Rosimeire S. Albuquerque^a, Aline A. Boligon^c, Margareth L. Athayde^c, João T. Calixto Júnior^d, Djair S. L. Souza^e, Edeltrudes Oliveira Lima^f, Irwin R. A. Menezes^b, José G. M. Costa^b, Felipe S. Ferreira^b, Henrique D. M. Coutinho^b.

^a *Department of Biological Sciences, Regional University of Cariri, Crato, Ceará – Brazil;* ^b *Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri, Crato, Ceará – Brazil;* ^c *Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do sul – Brazil;* ^d *Laboratory of Natural Products, State University of Ceará, Fortaleza, Ceará – Brazil;* ^e *ESAM, Federal University of the Semi Arid, Mossoró, Rio Grande do Norte – Brazil;* *Laboratory of Micology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba – Brazil.*

*Corresponding author. Tel.: (55) 88 3102 1212. E-mail address: flavianamoraisb@yahoo.com.br

ABSTRACT

*We assessed extracts from *Psidium brownianum* for antifungal activity and identified the phenolic phytochemicals. Minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by microdilution and IC₅₀ was calculated. The Minimum Fungicidal Concentration and the morphology of *Candida* were evaluated. Extracts analyzed by high performance liquid chromatography demonstrated flavonoids and phenolic acids. The MIC was 8192 µg/mL and the IC₅₀ varied between 1056 and 5128 µg/mL. Extracts showed fungistatic effect and altered the dimorphism of the strains, being the better result observed using the decoction, that affected the fungal dimorphism of the strain CA ATCC40006 at 4096 µg/mL.*

Keywords: *Antifungal activity; dimorphism; *Psidium brownianum*; *Candida*.*

INTRODUCTION

Infections caused by *Candida* species have been considered to be one of the biggest problems related to human fungal pathogens. The great and severe impact of the pathogenesis is related to the impairment of the immune system and the use of certain drugs that allow the emergence of invasive candidiasis, as for example, antibiotics against anaerobic microorganisms (1).

Candida albicans is a commensal polymorphic fungus and part of the human microbiota (2) with the highest prevalence of isolation either in healthy or diseased organisms (3). Regarded as a harmless commensal microbe, it may change status, becoming, in favorable conditions, an opportunistic pathogen capable of causing common clinical situations, such as thrush and vaginitis, to severe life-threatening infections, such as systemic infection known as candidemia (4).

A similar behavior is found in the fungus *Candida tropicalis*, which belongs to the same family (Saccharomycetaceae - Ascomycete) and same clade (CUG) as *C. albicans* (5). This fungus is responsible for high mortality rates ranging from 40 to 70% (6), where there are reports stating that in the intestine of cancer patients, it is much more invasive than *C. albicans* (7).

Drug resistance of these microorganisms has been determined and often reported to the point that many classes of antifungals have already been produced. The arsenal of drugs is designed to neutralize the virulence factors expressed by fungi as well as resistance mechanisms additivity or even multiple mechanisms (8,9,10).

Some studies have sought alternative sources of compounds able to neutralize virulence factors and mechanisms of fungal resistance, such as those investigating natural products (whether from plants or animals or other organisms) and their bioactive potential against fungi (11, 12). However, many of them have been unable to explain the mechanisms by which these products act.

Plants of the genus *Psidium* have been studied with regard to antifungal activity, in particular the species *Psidium guajava* (13). Besides them, *Psidium sartorianum* (14), *Psidium acutangulum* (15) and *Psidium guineense* Sw (16) have also been evaluated.

Psidium brownianum Mart. ex DC. occurs as a shrub or tree, reaching up to 0.5 to 8 m. It is a glabrous plant with leathery leaves and usually short petiole. Its flowers are white, and the fruit can vary between elliptical and striated and globose and grooved (17, 18). It can

often be found in regenerating areas, and its presence has been recorded in Northeast and Southeast Brazil, inhabiting different geographic areas, such as Caatinga, Cerrado and Atlantic Forest (18). The ethnobotanical use of *P. brownianum* has been observed in some places as food (fruit) or medicinal purposes (sprouts), for example, for the treatment of flu (19). To date, there has been no report on biological activity of this species.

The aim of this study was to evaluate the antifungal activity of extracts of *P. brownianum*, comparing the kinds of extracts by their methods of preparation (decoction, infusin and hydroethanolic), efficacy and effect against the fungal morphology.

MATERIAL AND METHODS

Collection area

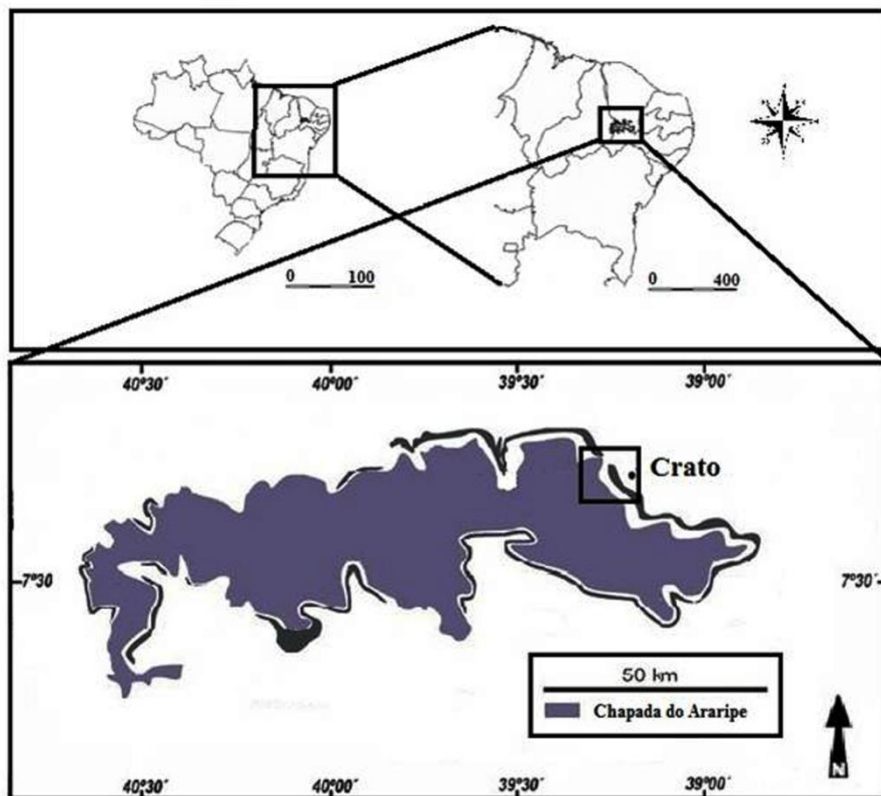
The area is characterized as an enclave of Cerrado *sensu stricto* (20) it is located in northeast Chapada do Araripe (7° 21.685' S and 39° 28.605' W, at 907 m asl; 7° 21.793' S and 39° 28.605' W, at 902 m asl; 7° 21.787' S and 39° 28.558' W, at 906 m asl) municipality of Crato, Ceara, in Northeast Brazil (Figure 1). Chapada do Araripe is situated at the border of the states of Ceará, Piauí and Pernambuco. It is a plateau, with a maximum altitude of 1000 m and minimum of 700 m. The predominant soil type is dystrophic red latosol (21). The average annual precipitation is about 760 mm, concentrated between the months of January and April (66.3%), and the average annual temperature is 24.1 °C (22).

Plant material

The study was conducted using young, healthy leaves of a *Psidium* species locally known as araçá de veado, which were collected and transported to the Laboratory of Microbiology and Molecular Biology at the Regional University of Cariri - URCA. Twigs with flowers of the species were also collected and vouchers were produced and deposited in the Herbarium Dárdano de Andrade Lima at the university under No. 10.161, where the species was identified as *Psidium brownianum* DC. The collection period included January, February, March and April, known as the "wintry block of the Cariri Ceara region." Collections were made between 8:30 and 10:30 am, and the plant material was taken to the laboratory. Leaves uncontaminated by parasites were washed and dried before being weighed and stored under refrigeration. Altogether, there were 2.866 kg of leaves in perfect condition, and this quantity was divided for preparation of three types of extracts: hydroethanolic extract

(70%) – EHPB, aqueous extract by decoction – AEPBD and water extract by infusion - AEPBI.

Figure 1 Collection area of *Psidium brownianum*



Barreiro Grande farm, Northeast of the Araripe Plateau, County of Crato, Ceará, Northeastern region of Brazil.

Preparation of extracts

Aqueous extracts:

Two types of aqueous extracts with natural tap water were prepared, each using 399.9 g of leaves mixed with 6 L of water (based on a proportion of 10 g/150 mL, equivalent to one cup of tea - 150 mL). The decoction was made by mixing roughly cut leaves in cold water and then boiling for 15 min. Afterwards, the tea was allowed to cool (4 h and 45 min), filtered and then stored under refrigeration. As for the infusion, the water was boiled without leaves, which were placed in the water after turning off the heat. The pot was covered with a lid and allowed to stand for 4 h 45 min until the tea cooled down (23), and the preparation was then filtered and stored under refrigeration. Infusion and decoction were frozen (-60 °C) and

lyophilized to dryness. The powdered extracts were stored under refrigeration for testing, using 24.9 and 23.3 g extract powder from the decoction and infusion, respectively.

Hydroethanolic extract:

The hydroethanolic extract (70%) was prepared by trituration with cold extraction, using a total of 2 kg leaves in a proportion of 5 g/mL of hydroethanol solution (23). The leaves were cut to increase contact surface with the solvent, and the mixture was left at room temperature protected from air and light, for a period of 96 h to for maximum extraction efficiency. The mixture was then filtered and placed in a rotary evaporator (Q-344B - Quimis - Brazil) at 40 rpm and 60 °C to concentrate the extract. Finally, the crude extract was frozen, lyophilized (568 g) and then stored under refrigeration.

Chemical analysis

Chemical, apparatus and general procedures:

All chemical were of analytical grade. Methanol, acetic acid, gallic acid, caffeic acid, ellagic acid and chlorogenic acid were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Quercetin, quercitrin, rutin, kaempferol, luteolin, catechin and coumarin were acquired from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). High performance liquid chromatography (HPLC-DAD) was performed with a Shimadzu Prominence Auto Sampler (SIL-20A) HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan), equipped with Shimadzu LC-20AT reciprocating pumps connected to a DGU 20A5 degasser with a CBM 20A integrator, SPD-M20A diode array detector and LC solution 1.22 SP1 software.

High performance liquid chromatography (HPLC-DAD):

Reverse phase chromatographic analyses were carried out under gradient conditions using C₁₈ column (4.6 mm x 250 mm) packed with 5 µm diameter particles; the mobile phase was water containing 2% formic acid (A) and acetonitrile (B), and the composition gradient was: 17% of B until 10 min and changed to obtain 20%, 30%, 50%, 60%, 70%, 20% and 10% B at 20, 30, 40, 50, 60, 70 and 80 min, respectively, following the method described (24) with slight modifications. The extracts solutions of *P. brownianum* (hydroethanolic - EHPB, infusion - AEPBI and decoction - AEPBD) were prepared at 20 mg/mL and the mobile phase were filtered through 0.45 µm membrane filter (Millipore) and then degassed by ultrasonic

bath prior to use. The flow rate was 0.7 mL/min and the injection volume was 50 µL. Stock solutions of standards references were prepared in water: acetonitrile (1:1; v/v) at a concentration range of 0.025 – 0.250 mg/mL catechin, coumarin, quercetin, quercitrin, kaempferol, luteolin and rutin, and 0.035 – 0.350 mg/mL for gallic, caffeic, ellagic and chlorogenic acids. Quantification was carried out by integration of the peaks using the external standard method, at 270 nm for gallic acid and coumarin, 281 nm for catechin, 327 nm for chlorogenic, ellagic and caffeic acids, and 366 for quercetin, quercitrin, luteolin, kaempferol and rutin. The chromatography peaks were confirmed by comparing its retention time with those of reference standards and by DAD spectra (200 to 600 nm). Calibration curve for gallic acid: $Y = 13682x + 1284.5$ ($r = 0.9999$); catechin: $Y = 11956x + 1260.3$ ($r = 0.9995$); caffeic acid: $Y = 11943x + 1198.7$ ($r = 0.9998$); chlorogenic acid: $Y = 12601x + 1327.1$ ($r = 0.9994$); ellagic acid: $Y = 13075x + 1283.9$ ($r = 0.9997$); rutin: $Y = 12853x + 1186.7$ ($r = 0.9996$); quercetin: $Y = 11968x + 1273.9$ ($r = 0.9998$); quercitrin: $Y = 12658x + 1249.7$ ($r = 0.9995$), coumarin: $Y = 13159x + 1358.2$ ($r = 0.9990$), kaempferol: $Y = 11983x + 1275.8$ ($r = 0.9999$) and luteolin: $Y = 12496x + 1195.4$ ($r = 0.9997$). All chromatography operations were carried out at ambient temperature and in triplicate.

Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ)

LOD and LOQ were calculated based on the standard deviation of the responses and the slope using three independent analytical curves (25). LOD and LOQ were calculated as 3.3 and 10 σ/S , respectively, where σ is the standard deviation of the response and S is the slope of the calibration curve.

Antifungal assay

Strains and culture media used:

Standard types of strains were obtained from the Culture Collection of Oswaldo Cruz of the Brazilian Institute of Quality Control in Health (INCQS) and clinical isolates of the yeasts *Candida albicans* and *Candida tropicalis* were provided by Dr. Edeltrudes Oliveira Lima (Mycology Laboratory of Paraíba Federal University), namely CA INCQS 40006, CA LM 62, CA LM 77, CA LM 109, CA LM 111, CA LM 122, CT INCQS 40042, CT LM 18, CT LM 20 and CT LM 23. These strains were inoculated into Sabouraud dextrose agar (SDA, KASVI) and incubated for 24 h at 37°C. Afterwards, small aliquots of yeast were transferred

to test tubes each containing 3 mL of sterile saline (0.9%). The concentration of the inoculum was standardized by 0.5 McFarland, giving a standard yeast suspension of 1×10^5 cells/mL (26). The inocula thus prepared were used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) in Sabouraud dextrose broth (SDB, HIMEDIA), double concentrated. Another culture medium was used for analysis of yeast micromorphology. The potato dextrose agar (PDA, DIFCO) was prepared by diluting it more than that recommended by the manufacturer to make it a depleted medium capable of stimulating yeast to produce hyphae. Agar was added to this diluted medium to obtain a solid medium.

Drugs, reagents and preparation of solutions:

Dimethyl sulfoxide (DMSO, Merck, Darmstadt, Germany) was used for dilution of the extracts, and the antifungal fluconazole (Capsule - FLUCOMED), diluted in water, was used as the reference drug. The matrix solutions of the extracts were prepared by weighing 0.3 g of each extract and then diluting in 1 mL of DMSO. To obtain the desired concentration for testing, the extracts were further diluted in sterile distilled water so that the concentration of DMSO in the natural product did not exert any activity in the test cells (27).

Microbiological screening

Microbiological screening was performed to select the yeasts to be used in microbiological testing. The microdilution broth was chosen to perform this procedure, and this was done by determining the MIC (28). The plates prepared to carry out this test would be used later in tests to find the minimum fungicidal concentration, besides facilitating the demonstration of cell viability curve and calculating the IC_{50} of the test products.

Determination of minimum inhibitory concentration (MIC)

This test was performed by the broth microdilution method in 96-well plates. Each well was filled with 100 μ L of SDB containing 10% fungal inoculum, and then, 100 μ L of the natural product (16384 μ g/mL) or fluconazole (antifungal reference) at the same concentration, were added to the first well, followed by twofold serial dilution. The concentrations in the wells ranged from 64 to 8192 μ g/mL. The last well contained no extract or drug and served as the normal growth control (28). Controls for diluent of the products (using saline instead of inoculum) and the sterile medium were also prepared. All tests were performed in triplicate. The plates were incubated at 37 °C for 24 h and afterwards read in an

ELISA spectrophotometer (Thermoplate®) at a wavelength of 630 nm. The MIC was defined as “the lowest concentration of an antimicrobial agent that inhibit the visible growth of an microorganism in dilution assays” (26). The results obtained in the ELISA readout were used to construct the cell viability curve and the IC₅₀ of the extracts of *P. brownianum*.

Determination of minimum fungicidal concentration (MFC)

For this test, a small sterile rod was placed in each well of the MIC test plate (except for sterility control). After mixing the medium in each well, the rod was taken to a large petri dish containing SDA, streaking its surface and transferring the solution (medium + inoculum + natural product) for subculture of yeast and checking cell viability. After 24 h incubation, the plates were inspected for any formation of colonies of *Candida* (29 with modifications). The concentration at which there was no growth of fungal colonies was considered the MFC of the natural product.

Effect of natural products on fungal morphology

To determine if the natural product caused any change in fungal morphology, by inhibiting the development of hyphae, sterile micromorphological chamber slides were prepared for observation of yeasts. Three milliliters of PDA medium depleted by dilution were added to chambers, containing the natural product concentrations MIC/2, MIC and MIC x 2. Aliquots of the inoculi were taken from the petri dishes to make two parallel streaks on the solid medium, which were then covered with a sterile coverslip. The chambers were placed in the incubator for 24 h (37 °C) and inspected under a light microscope using a 40X objective. A camera was attached to the microscope to capture images randomly at 5X zoom. A control for yeast growth (hyphae stimulated by depleting medium) was performed, as well as a control with the conventional antifungal fluconazole for comparative purposes and a control with DMSO at 100% and 0.5% (the concentration in the natural products used in the tests) (30, 31 with some modifications).

Statistical analysis

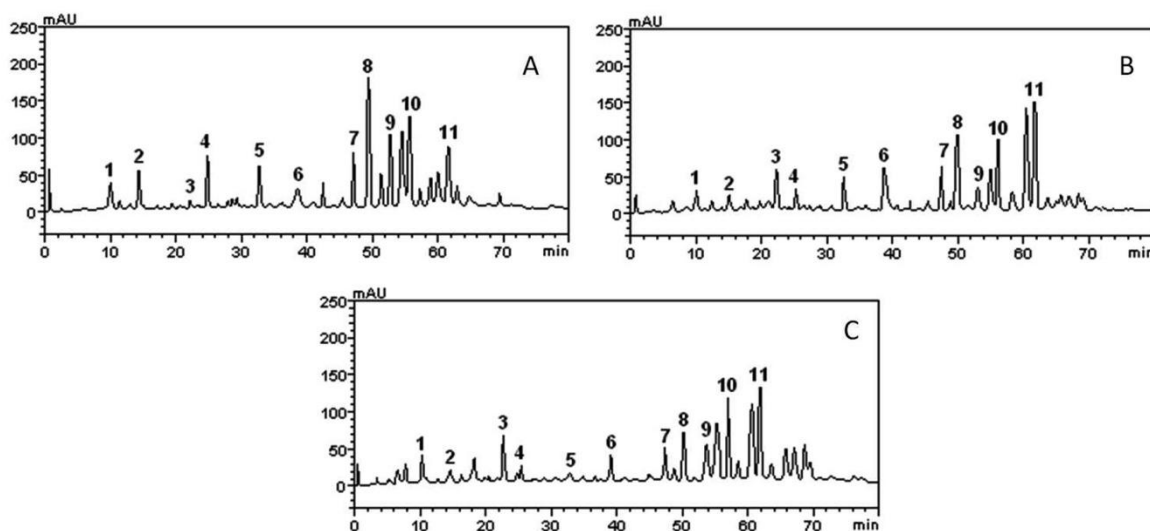
The results of the tests were done in triplicate. Data obtained for each sample and concentration were checked for their normal distribution and then analyzed by one-way ANOVA by post hoc Tukey test. IC₅₀ values were obtained by nonlinear regression for the purpose of interpolating values from standard curves (using the software Graphpad Prism, v.

5.0) of the % *growth* values plotted against concentration and EC₅₀ values are expressed as µg/mL.

RESULTS AND DISCUSSION

High performance liquid chromatography (HPLC) was used to analyze the chemical composition of the *P. brownianum* extracts, which detected and quantified the phenolic compounds present. However, as it can be seen in Figure 2, the HPLC profile, the HPLC profile showed other minor compounds in addition to gallic acid (retention time-*t_R* 9.98 min, peak 1), catechin (*t_R* = 14.35 min, peak 2), chlorogenic acid (*t_R* = 22.03 min, peak 3), caffeic acid (*t_R* = 25.11 min, peak 4), ellagic acid (*t_R* = 33.07 min, peak 5), rutin (*t_R* = 38.49 min, peak 6), quercitrin (*t_R* = 47.68 min, peak 7), quercetin (*t_R* = 49.73 min, peak 8), coumarin (*t_R* = 53.81 min, peak 9), kaempferol (*t_R* = 55.78 min, peak 10) and luteolin (*t_R* = 61.94 min, peak 11). The findings for each extract are shown in Figure 2, with the peaks confirmed by chromatography, and the amounts for each chemical constituent are given in Table 1, demonstrating the presence of flavonoids and phenolic acids.

Figure 2 High performance liquid chromatography phenolics and flavonoids profile of *Psidium brownianum*



A. Hydroethanolic Extract of *Psidium brownianum*; B. Aqueous Extract of *P. brownianum* decoction; C. Aqueous Extract of *P. brownianum* infusion. High performance liquid chromatography phenolics and flavonoids profile of *P. brownianum*. Gallic acid (peak 1), catechin (peak 2), chlorogenic acid (peak 3), caffeic acid (peak 4), ellagic acid (peak 5), rutin (peak 6), quercitrin (peak 7), quercetin (peak 8), coumarin (peak 9), kaempferol (peak 10) and luteolin (peak 11).

The different times of exposure to temperature of the aqueous (decoction and infusion) extracts resulted in the extraction of compounds in different amounts, where the decoction showed slightly higher amounts than the infusion with little significant difference. However, the decreasing order of the major constituents also varied: decoction: luteolin > quercetin > kaempferol > quercitrin > rutin; and infusion: luteolin > kaempferol > quercetin > chlorogenic acid > quercitrin acid. The results for the hydroethanolic extract of the species showed the five major ones in the following order: quercetin > kaempferol > coumarin > quercitrin > luteolin. In terms of the amount of phenolic compounds extracted from 20 mg of each extract, the order was EHPB > AEPBD > AEPBI, showing that the hydroethanolic extract was richer in these phytochemicals (Table 1).

Table 1 Phenolics and flavonoids composition of *Psidium brownianum*.

Compounds	<i>P. brownianum</i>			LOD	LOQ
	EHPB mg/g	AEPBD mg/g	AEPBI mg/g	µg/mL	µg/mL
Gallic acid	3.15 ± 0.02 a	1.73 ± 0.01 a	2.98 ± 0.01 a	0.019	0.062
Catechin	4.28 ± 0.01 b	1.69 ± 0.01 a	1.70 ± 0.03 b	0.008	0.025
Chlorogenic acid	0.09 ± 0.01 c	4.05 ± 0.03 b	3.95 ± 0.02 c	0.024	0.081
Caffeic acid	5.41 ± 0.03 d	1.76 ± 0.01 a	1.68 ± 0.01b	0.035	0.116
Ellagic acid	4.35 ± 0.01 b	3.84 ± 0.02 b	1.62 ± 0.01b	0.010	0.034
Rutin	2.67 ± 0.01 e	4.29 ± 0.01 c	2.89 ± 0.03 a	0.017	0.056
Quercitrin	5.63 ± 0.02 f	4.32 ± 0.01 c	3.11 ± 0.01 a	0.032	0.105
Quercetin	11.54 ± 0.02 g	7.08 ± 0.03 d	4.05 ± 0.02 c	0.025	0.083
Coumarin	7.18 ± 0.02 h	1.81 ± 0.02 a	3.10 ± 0.03 a	0.011	0.037
Kaempferol	8.93 ± 0.01 i	6.97 ± 0.01 d	6.92 ± 0.01d	0.018	0.059
Luteolin	5.61 ± 0.01 f	10.34 ± 0.02 e	8.37 ± 0.01 e	0.023	0.075

Results are expressed as mean ± standard deviation of the determinations. Averages followed by different letters on each extract differ by Tukey test at $p < 0.05$. AEPBI: Aqueous Extract of *P. brownianum* Infusion; AEPBD: Aqueous Extract of *P. brownianum* Decoction; EHPB: Hydroethanolic Extract of *P. brownianum*.

The antimicrobial screening revealed that a minimum concentration of the extract able to inhibit the growth of the strains was the same ($> 8192 \mu\text{g/mL}$), and thus, the selection of the strains was performed randomly. For continuity of the work, we selected the yeast strains INCQS CA 40006, CA LM 77, INCQS 400042 CT and CT LM 23. For comparative purposes, therefore, a standard strain and a clinical strain isolated from each species were

used. Fluconazole was used as the control, which, as expected, had a lower IC₅₀ (58.63 to 76.72 µg/mL) compared to the extracts (1056.82 to 5128.61 µg/mL) (Table 2). In this context, extracts of *P. brownianum* demonstrated antifungal potential due the fact of inhibit the virulence mechanism of morphogenesis. So, these extracts can be used against the candidiasis but not against systemic infections due the high doses required for this activity.

Table 2 IC₅₀ of all products assayed (µg/mL).

Yeast Strains	EHPB	AEPBD	AEPBI	Fluconazole
CAINCQS 40006	1056.82	2924.15	4073.8	76.72
CA LM 62	1840.77	3872.58	4764.31	81.35
CA LM 77	1199.5	3090.3	4168.69	69.09
CA LM 109	1396.37	3689.78	4602.57	72.49
CA LM 111	1862.09	2460.37	4677.35	103.4
CA LM 122	1076.47	3162.28	4677.35	103.4
CTINCQS 40042	1333.52	3589.22	5011.87	73.98
CT LM 18	1651.96	3890.45	4943.11	391.2
CT LM 20	1815.52	3630.78	5128.61	205.5
CT LM 23	1883.65	3597.49	4655.86	58.63

Aqueous Extract of *P. brownianum* Infusion; AEPBD: Aqueous Extract of *P. bronianum* Decoction; EHPB: Hydroethanolic Extract of *P. brownianum*.. The indicated strains in bold were utilized in the assays.

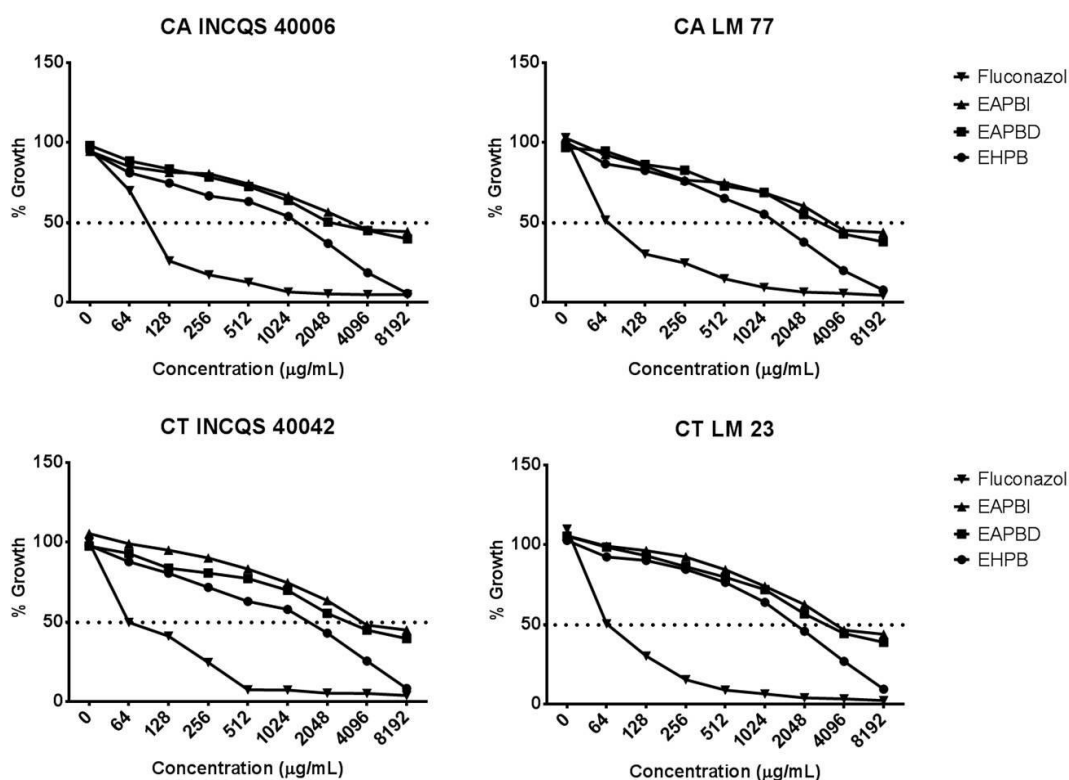
The IC₅₀ was calculated for each test product using the ELISA readings, where the IC₅₀ values differed but were generally high, ranging from 1056.82 to 5128.61 µg/mL (Table 2). A graph demonstrating the effect on cell viability of the selected yeasts is presented in Figure 3.

It is important to note that the type of solvent and extraction method did not influence the results obtained from the MIC and MFC tests. Also, the determination of the potential to inhibit the transition of yeasts was not affected, since aqueous extracts (obtained using different times of exposure to heat) and hydroethanolic extracts showed the same effect at the same concentrations tested.

To determine the concentration of the test products necessary to exert a fungicidal effect, tested concentrations ranged from 64 to 8192 µg/mL and after 24 h incubation, fungal growth was observed in all cases, showing that the minimum fungicidal concentration was higher than 8192 µg/mL.

DMSO (100%) was found to have an effect on the morphology of *Candida* yeasts (data not shown), but at the concentration at which the products were diluted for testing, this activity was absent, as can be seen in Figure 4.

Figure 3 Cell viability curve *Candida* strains under the effect of *Psidium brownianum*



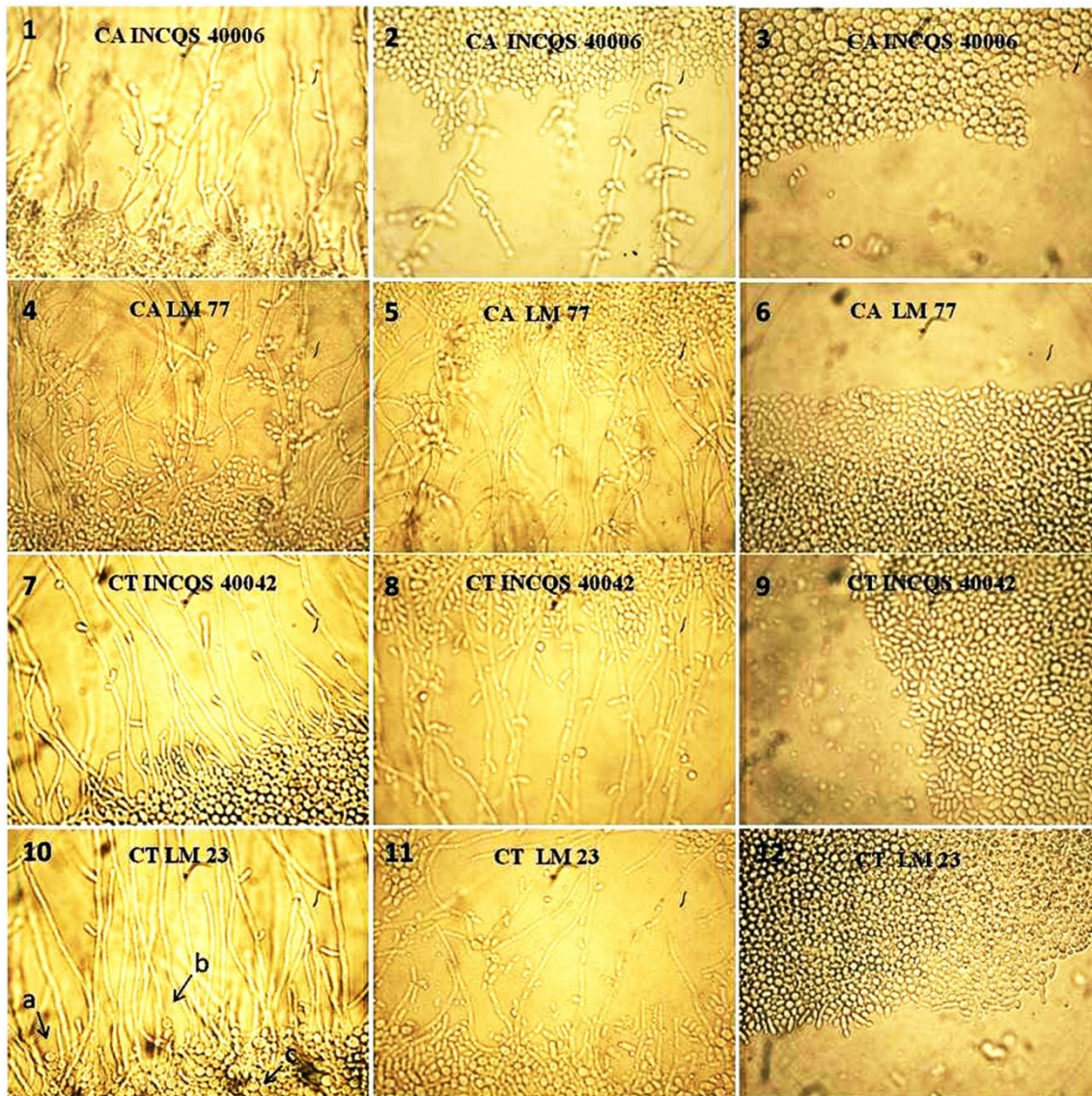
CT: *Candida tropicalis*; CA: *Candida albicans*; AEPBI: Aquous Extract of *P. brownianum* Infusion; AEPBD: Aquous Extract of *P. bronianum* Decoction; EHPB: Hidroethanolic Extract of *P. brownianum*.

Fluconazole, a drug used as a control in testing, is a drug that acts on the fungal membrane, causing loss of integrity (32). It showed an inhibitory effect on hyphae at a lower concentration compared to the products tested, as can be seen in Figure 4. This effect was expected, since the MIC of this antifungal was well below the values expressed by the products tested.

The extracts tested, at the highest concentration (16,384 µg/mL), prevented the morphological transition of yeasts, with the exception of strain CA 40006, which was affected by MIC/2 (4,096 µg/mL) of decoctio, with progressive inhibition at higher concentrations (8,192 e 16,384 µg/mL), (Figures 5 and 6). The extracts probably influenced the genetic and biochemical processes occurring in the cell wall of yeast, disrupting the formation of

pseudohyphae and hyphae and thereby affecting one of the factors responsible for the virulence of the species, the ability to invade substrates.

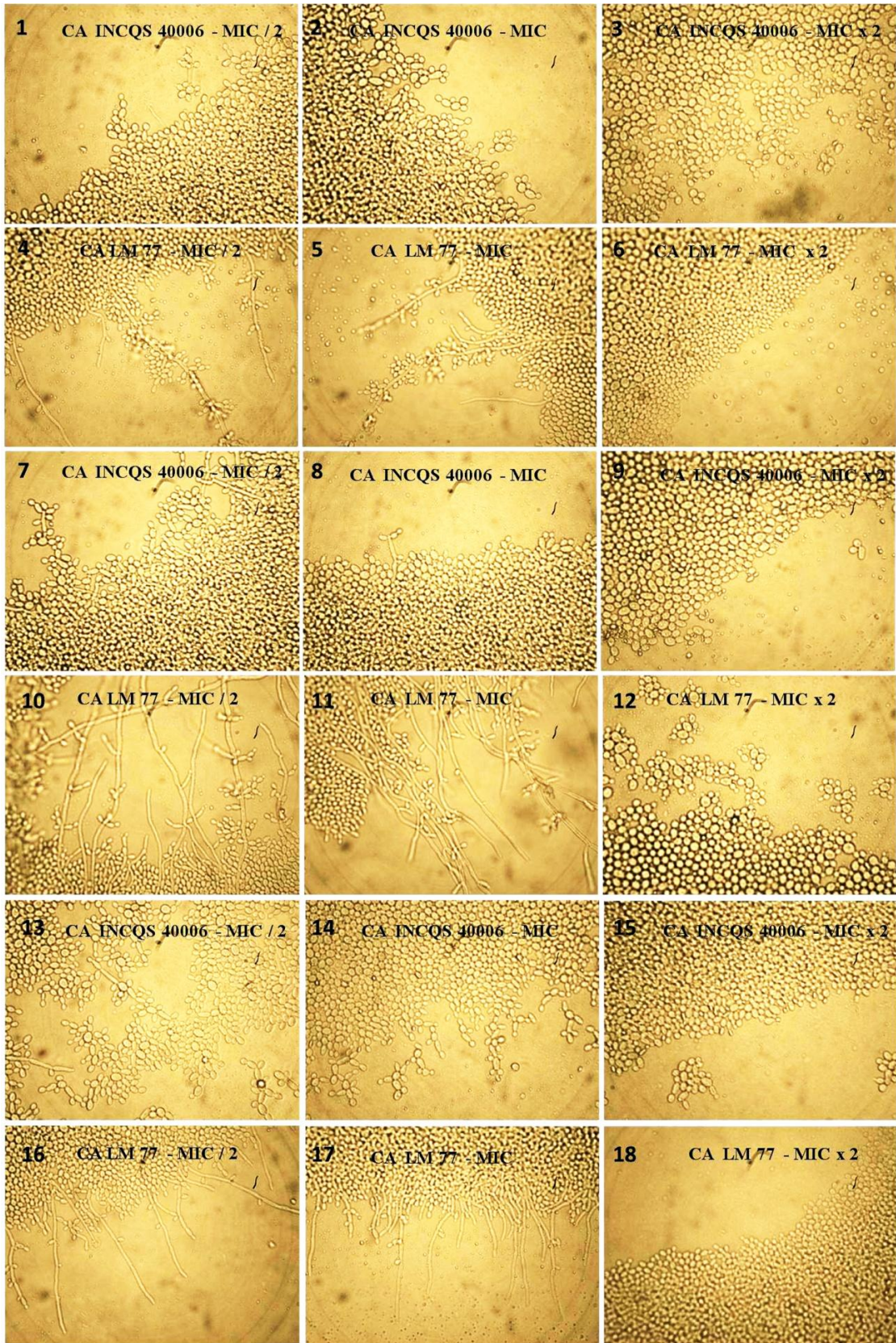
Figure 4 Controls used in Micromorphologic assay of *Candida* yeast under the effect of the products of *Psidium brownianum*



The microculture of *Candida* with diluted Potato Dextrose Agar. In the square 10 can be observed the different kinds of cells demonstrated by the morphological transition of *Candida*: a: pseudohyphae; b: hyphae; c: yeast. Microculture incubated by 24 h at 37 °C. 1, 4, 7 and 10: Growth control; 2, 5, 8 and 11: DMSO 0,05%; 3, 6, 9 and 12: Fluconazole; CA: *Candida albicans*; CT: *Candida tropicalis*.

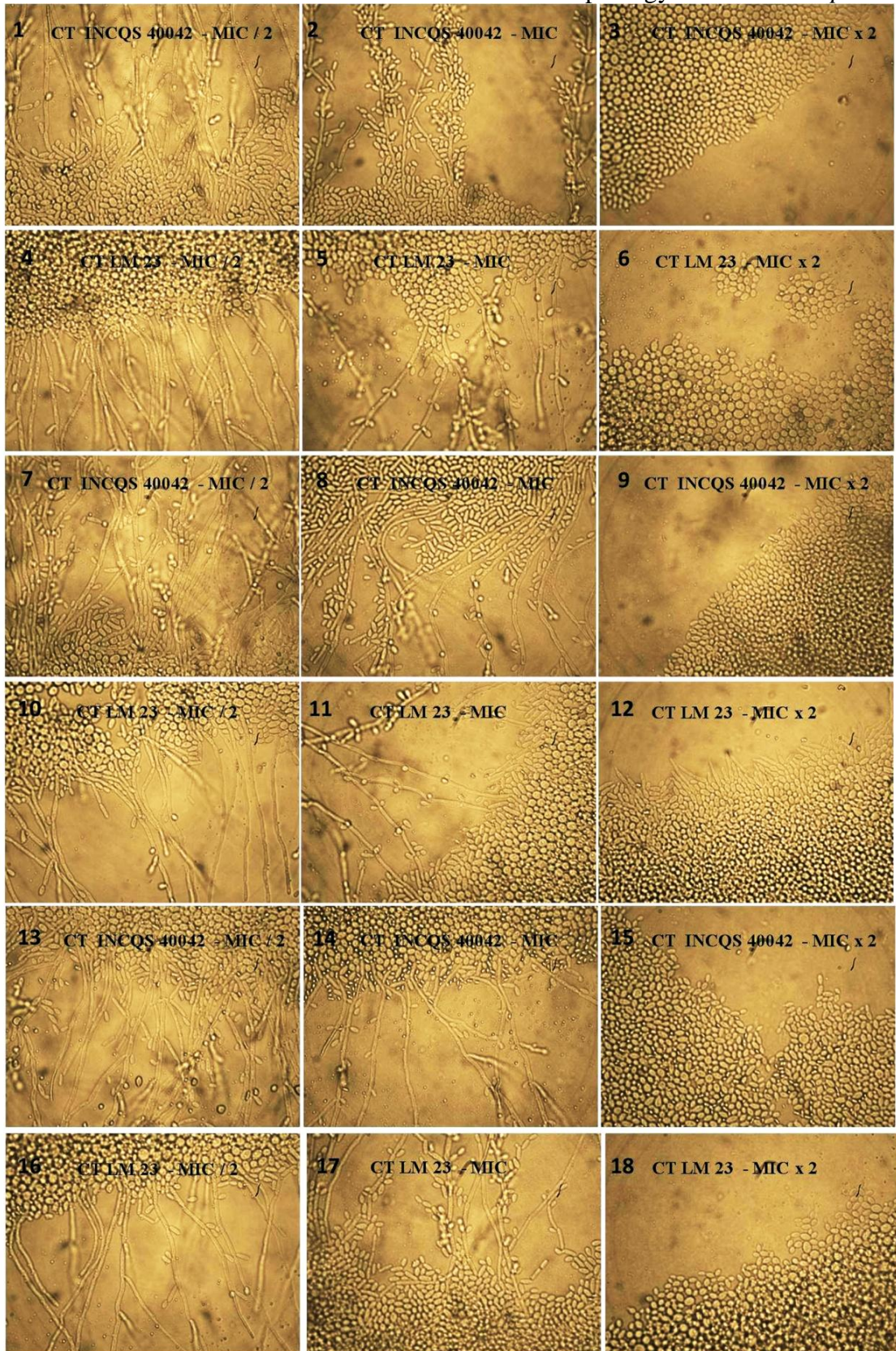
The activity of phenolic compounds against *Candida* has been reported in some studies (33, 34, 35, 36), also demonstrating a concentration-dependent effect (37). The extracts evaluated here just started to show some antifungal activity when the concentration of phenolic compounds in the extract gradually increased as demonstrated in the cell viability curves.

5 Effect of *Psidium brownianum* extracts on the morphology of *Candida albicans*



Concentrations MIC / 2, MIC e MIC x 2 (4,096, 8,192 and 16,384 $\mu\text{g/mL}$, respectively). Aquous Extract of *P. brownianum* Decoction (AEPBD): 1 - 6; Aquous Extract of *P. brownianum* Infusion (AEPBI): 7 - 12; Hydroethanolic Extract of *P. brownianum* (EHPB): 12 - 18.

Figure 6 Effect of *Psidium brownianum* extracts on the morphology of *Candida tropicalis*



Concentrations MIC / 2, MIC e MIC x 2 (4,096, 8,192 and 16,384 $\mu\text{g/mL}$, respectively). Aquous Extract of *P. brownianum* Decoction (AEPBD): 1 - 6; Aquous Extract of *P. brownianum* Infusion (AEPBI): 7 - 12; Hydroethanolic Extract of *P. brownianum* (EHPB): 12 - 18.

Micromorphological analysis could indicate a possible mechanism of action of the tested products, because it allows the observation of changes in morphology of the strains. The formation of hyphae and pseudohyphae, observable in a micromorphology assay are important virulence factors in the development of candidiasis (38). The morphological transition between the yeast and hyphal forms of *Candida*, that is, dimorphism, is one of the pathogenicity mechanisms appearing as a fitness attribute in superficial and systemic infections, where yeast and hyphae have spreading and invasive potential, respectively (2). Morphological changes in *Candida* are stimulated by various environmental factors, and thus, changes in pH, CO₂, temperature, depletion of nutrients, serum or presence of N-acetylglucosamine, as well as quorum sensing mechanisms, can promote the formation of hyphae (2). This hyphal growth depends on the expression of various genes of cell wall proteins, transduction pathways, transcription factors, down regulation, activation of cyclic nucleotide-dependent protein kinase, phosphorylation reactions and some ribosomal proteins (39). The adhesion of the hyphae to the surface at the time of invasion, is favored by a set of proteins, adhesins (2).

In our assays, nutrient depletion was the factor that triggered the development of hyphae. In the presence of depleted medium, the fungi responded to the stress condition by activating the genetic and biochemical processes necessary for the formation of pseudohyphae and hyphae. Figure 4 shows the growth of strains in depleted medium.

A previous study found that the flavonoid extract from multifloral honey containing luteolin was able to inhibit the dimorphic conversion of *C. albicans* and that this effect could be related to the inhibition of the production of reactive oxygen species and changes in cellular levels of intracellular glutathione, both factors that significantly influence the conversion of yeasts to hyphae (37). Also aimed at elucidating the probable mechanism of action of the effect of this extract on yeast transition, another study found that the inhibitory activity of the flavonoid extract of honey could be attributed to changes in cell cycle progression, membrane integrity, mitochondrial function and also biogenesis (40).

Methanolic extract of *Leiothrix spiralis* and luteolin were effective against *Candida* species, however only the extract interfered with formation of hyphae, indicating that effect on inhibition of hyphae cannot be attributed to flavonoid luteolin alone, but it was probably due to phenolic compounds presents in methanolic extract (41). Therefore, considering the potential of phenolic compounds for inhibiting the dimorphic transition process in yeast and their existence in extracts of *P. brownianum*, we can assume that the effect exhibited by

extracts was due to these phytochemicals through a single contribution (except for luteolin) or in a synergistic fashion. Luteolin is the major compound in the aqueous extracts, and the fact that its presence did not interfere in the extracts' effect on yeast morphology suggests that the inhibitory effect was due to the activity of other compounds or to their synergistic action. The possibility of luteolin being involved in this possible synergistic process cannot be ruled out.

In the ether extract of Italian multifloral honey, flavonoids including luteolin, quercetin, apigenin, kaempferol and isorhamnetin were found. The extract presented a better effect than components separately assayed, suggesting that synergism between phenolic compounds is an important factor in natural products exerting an antimicrobial effect (42).

Finally, given the above, this study showed low antimicrobial activity of *P. brownianum* against *Candida*. However, in relation to mucocutaneous fungal infections caused by *Candida* (43), the topical use of this natural product can be demonstrated as a local inhibitor of fungal virulence, hindering morphogenesis and the invasion of tissues. Our results did not focus on a direct clinical indication, as many complementary tests are needed, such as toxicity tests.

CONCLUSION

In this study, it was found that the mechanism of action by which the extracts of *P. brownianum* act is by altering capacity for morphological transition in yeasts, preventing the conversion from yeast to hyphae and pseudohyphae. The complete elucidation of this mechanism needs further study. The antifungal potential observed is presumably attributed to phenolic compounds found in the extracts (flavonoids and phenolic acids), whose levels did not significantly differ between the extracts, and their possible synergistic effect. However, more specific studies are needed to reach a definitive conclusion. This is the first report of biological activity for this species, and the results reveal that *P. brownianum* is a source of phytochemicals able to inhibit the morphological transition of strains of *C. albicans* and *C. tropicalis*, neutralizing one of their major virulence factors, the ability to invade substrates and consequently tissues. This effect is potentially promising, but more studies are needed for the possible development of drugs for topical use.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to the Brazilian Research agencies: CNPq, CAPES and FUNCAP by the financial and grant support.

REFERENCES

1. Kriengkauykiat, J.; Ito, J.I.; Dadwal, S.S. Epidemiology and treatment approaches in management of invasive fungal infections. *Clinical Epidemiology*, 2011, 3, 175-191.
2. Mayer, F.L.; Wilson, D.; Hube, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 2013, 4, 119–128.
3. Silva, S.; Negri, M.; Henriques, M.; Oliveira, R.; Williams, D.W.; Azeredo, J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiology Reviews* 2012, 36, 288-305.
4. Fazly, A.; Jain, C.; Dehner, A.C.; Issi, L; Lilly, E.A.; Ali, A.; Cao, H.; Fidel Jr., P.L.; Rao, R.P.; Kaufman, P.D. Chemical screening identifies filastatin, a small molecule inhibitor of *Candida albicans* adhesion, morphogenesis, and pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013, 110, 13594-13599.
5. Kim, J.; Sudbery, P. *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. *The Journal of Microbiology*, 2011, 49, 171-177.
6. Chen, Y.L., Yu, S.J., Huang, H.Y., Chang, Y.L., Lehman, V.N., Silao, F.G.S., Bigol, U.G.; Bungay, A.A.C.; Averette, A.; Heitman, J. Calcineurin controls hyphal growth, virulence, and drug tolerance of *Candida tropicalis*. *Eukaryotic cell*, 2014, EC-00302.
7. Kothavade, R.J.; Kura, M.M.; Valand, A.G.; Panthaki, M.H. *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. *Journal of Medical Microbiology*, 2010, 59, 873-880.
8. Jiang, C.; Dong, D.; Yu, B.; Cai, G.; Wang, X.; Ji, Y.; Peng Y. Mechanisms of azole resistance in 52 clinical isolates of *Candida tropicalis* in China. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2013, 68, 778-785.
9. Pfaller, M.A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *The American Journal of Medicine*, 2012, 125, S3-S13.
10. Sardi, J.C.O.; Scorzoni, L.; Bernardi, T.; Fusco-Almeida, A.M.; Giannini, M.J.S. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of Medical Microbiology*, 2013, 62, 10-24.
11. Giordani, C.; Santin, R.; Cleff, M. Survey of plant extracts with anti-*Candida* activity in the 2005-2013 period. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 2015,17, 175-185.
12. Chen, M.; Zhai, L.; Arendrup, M.C. *In vitro* activity of 23 tea extractions and epigallocatechin gallate against *Candida* species. *Medical Mycology*, 2015, 53, 194-198.
13. Suwanmanee, S.; Kitisin, T.; Luplertlop, N. *In vitro* screening of 10 edible thai plants for potential antifungal properties. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014, 7.
14. Camacho-Hernández, I.L.; Cisneros-Rodríguez, C.; Uribe-Beltrán, M.J.; Ríos-Morgan, A.; Delgado-Vargas, F. Antifungal activity of fruit pulp extract from *Psidium sartorianum*. *Fitoterapia*, 2004, 75, 401–404.
15. Wen, L., Haddad, M., Fernández, I., Espinoza, G., Ruiz, C., Neyra, E., Bustamante B.; Rojas, R. Actividad antifúngica de cuatro plantas usadas em la medicina tradicional

- peruana. Aislamiento de 3'-Formil – 2',4',6' – trihidroxidihidrochalcona, principio activo de *Psidium acutangulum*. Revista da Sociedade Química del Perú 2011, 77, 199-204.
16. Lapenna, E.A.M.; Ramírez, G.E.M.; Díaz, L.; Aguillón, K.; Marín, H. Actividad bactericida y fungicida de algunas plantas utilizadas en la medicina tradicional venezolana. Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel, 2003, 34, 6-9.
 17. Oliveira, A.G. de. *Diversidade de Myrtaceae das restingas de Conceição da Barra e São Mateus, Espírito Santo, Brasil*. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Botânica. Escola Nacional de Botânica Tropical. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2013.
 18. Sobral, M.; Proença, C.; Souza, M.; Mazine, F.; Lucas, E. *Myrtaceae* in *Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB171>>. Acesso em: 23 Set. 2014.
 19. De Jesus, M.C.F. *Levantamento das espécies de restinga utilizadas nas comunidades de Pontal do Ipiranga e Degredo, Linhares, ES*. Dissertação de Mestrado em Biodiversidade Tropical. Departamento de Ciências Agrárias e Biológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus, 2012.
 20. Ribeiro, J.F.; Walter, B.M.T. (Fitofisionomias do Bioma Cerrado. In: *Cerrado: Ambiente e Flora*. Sano, S.M.; Almeida, S.P. (Eds.), Brasília: EMBRAPA-CPAC, 1998; 89-166.
 21. Brasil. Mapa exploratório-reconhecimento de solos: estado do Ceará, escala 1:600.000. *Superintendência de Desenvolvimento do Nordeste* (SUDENE), 1972.
 22. Costa, I.R.; Araújo, F.S. Lima-Verde, L.W. Flora e aspectos autoecológicos de um enclave de cerrado na chapada do Araripe, Nordeste do Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, 2004, 18, 759-770.
 23. Matos, F.J.A. *Farmácias vivas* (4ª ed.). Fortaleza: Editora UFC, 2002; p. 36-40.
 24. Kamdem, J.P., Olalekan, E.O., Hassan, W., Kade, J., Yetunde, O., Boligon, A.A. *Trichilia catigua* (Catuaba) bark extract exerts neuroprotection against oxidative stress induced by different neurotoxic agents in rathippocampal slices. *Industrial Crops and Products*, 2013, 50, 625- 632.
 25. Silva, A.R.H., Moreira, L.R., Brum, E.S., Freitas, M.L., Boligon, A.A., Margareth, L.A., Roman, S.S.; Mazzanti, C.M.; Brandão, R.. Biochemical and hematological effects of acute and sub-acute administration to ethyl acetate fraction from the stem bark *Scutia buxifolia* Reissek in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 2014, 153, 908-916.
 26. NCCLS Norma M27-A2. *Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade à Terapia Antifúngica das leveduras*; Norma Aprovada – Segunda Edição. Norma M27-A2 do NCCLS (ISBN 1-56238-469-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002.
 27. Stoppa, M.A.; Casemiro, L.A.; Vinholis, A.H.C.; Cunha, W.R.; Silva, M.L.A.; Martins, C.H.G.; Furtado, N.A.J.C. Estudo comparativo entre as metodologias preconizadas pelo CLSI e pelo EUCAST para avaliação da atividade antifúngica. *Química Nova* [online], 2009, 32, 498-502.
 28. Javadpour, M.M.; Juban, M.M.; Lo, W.C.; Bishop, S.M.; Alberty, J.B.; Cowell, S.M.; Becker, C.L.; Mclaughlin, M.L. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1996, 39, 107–3113.
 29. Ernst, E.J.; Klepser, M.E.; Ernst, M.E.; Messer, S.A.; Pfaller, M.A. (1999). *In vitro* pharmacodynamic properties of MK-0991 determined by time-kill methods. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 33, 75-80.
 30. Sidrin, J.J.C.; Rocha, M.F.G. *Micologia médica à luz de autores contemporâneos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010, p. 388.
 31. Mendes. J.M. *Investigação da atividade antifúngica do óleo essencial de Eugenia caryophyllata Thunb. sobre cepas de Candida tropicalis*. Dissertação de Mestrado em

- Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Universidade Federal da Paraíba – UFPB, João Pessoa – PB, 2011.
32. Costa, L.C.G.; Alves, S.F.; Nogueira, S.A.; Carvalho, G.K. Determinação do teor de fluconazol em cápsulas industriais e magistrais. *Revista Faculdade Montes Belos*, 2014, 7, 47-56.
 33. Alves, C.T.; Ferreira, I.C.; Barros, L.; Silva, S.; Azeredo, J.; Henriques, M. Antifungal activity of phenolic compounds identified in flowers from North Eastern Portugal against *Candida* species. *Future microbiology*, 2014, 9, 139-146.
 34. Barros, L.; Dueñas, M.; Alves, C.T.; Silva, S.; Henriques, M.; Santos-Buelga, C.; Ferreira, I.C.F.R. Antifungal activity and detailed chemical characterization of *Cistus ladanifer* phenolic extracts. *Industrial Crops and Products*, 2013, 41, 41-45.
 35. Tempesti, T.C.; Alvarez, M.G.; de Araújo, M.F.; Júnior, F.E.A.C.; de Carvalho, M.G.; Durantini, E.N. Antifungal activity of a novel quercetin derivative bearing a trifluoromethyl group on *Candida albicans*. *Medicinal Chemistry Research*, 2012, 21, 2217-2222.
 36. Vashisth, P.; Nikhil, K.; Pemmaraju, S.C.; Pruthi, P.A.; Mallick, V.; Singh, H., Patel A.; Mishra, N.C.; Singh, R.P.; Pruthi, V. Antibiofilm activity of quercetin-encapsulated cytocompatible nanofibers against *Candida albicans*. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 2013, 28, 652-665.
 37. Candiracci, M.; Citterio B.; Piatti, E. Antifungal activity of the honey flavonoid extract against *Candida albicans*. *Food Chemistry*, 2012, 131, 493-499.
 38. Köhler, J.R.; Arturo C.; John, P. The Spectrum of Fungi That Infects Humans. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2015, 5, a019273.
 39. Kim, J.; Sudbery, P: *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. *The Journal of Microbiology*, 2011, 49,171–172.
 40. Canonico, B.; Candiracci, M.; Citterio, B.; Curci, R.; Squarzoni, S.; Mazzoni, A.; Papa, S.; Piatti, E. Honey flavonoids inhibit *Candida albicans* morphogenesis by affecting DNA behavior and mitochondrial function. *Future microbiology*, 2014, 9, 445-456.
 41. Araújo, M.G.F., Hilário, F., Vilegas, W., Santos, L.C., Brunetti, I.L., Sotomayor, C.E., Bauab, T.M. Correlation among antioxidant, antimicrobial, hemolytic and antiproliferative properties of *Leiothrix spiralis* leaves extract. *International journal of molecular sciences*, 2012, 13, 9260-9277.
 42. Candiracci, M.; Citterio, B.; Diamantini, G., Blasa, M.; Accorsi, A.; Piatti, E. Honey flavonoids, natural antifungal agents against *Candida albicans*. *International Journal of Food Properties*, 2011,14, 799–808.
 43. Reyes, J.V.; Arenas, R. Candidiasis mucocutánea. Una revisión. *Revista Mexicana de Micología*, 2007, 25, 91-104.

ARTIGO 4

**7 ARTIGO 4: *Psidium guajava* L. E *Psidium brownianum* MART EX DC.:
COMPOSIÇÃO QUÍMICA E EFEITO ANTI - *CANDIDA* EM ASSOCIAÇÃO COM
FLUCONAZOL**

Maria Flaviana B. Morais-Braga, Débora L. Sales, Antonio Júdsen T. Machado, Antonia Thassya L. de Souza, Joara Nalyda P. Carneiro, Maria Audilene de Freitas, Gioconda Morais de A. Bezerra Martins, Nadghia Figueiredo Leite, Saulo R. Tintino, Djair S. L. Souza, Irwin R. A. Menezes, José G. M. Costa, Henrique D. M. Coutinho.

Artigo submetido no periódico *Microbial Pathogenesis*

Fator de Impacto: 1.794

(Comprovante de submissão no Anexo C)



***Psidium guajava* L. e *Psidium brownianum* Mart ex DC.: composição química e efeito anti - *Candida* em associação com fluconazol**

Maria Flaviana B. Morais-Braga^{1*}, Débora L. Sales², Joara Nalyda P. Carneiro¹, Antonio Júdson T. Machado¹, Antonia Thassya L. dos Santos¹, Maria Audilene de Freitas², Gioconda Morais de A. Bezerra Martins², Nadghia Figueiredo Leite¹, Yedda Maria L. S. de Matos¹, Saulo R. Tintino¹, Djair S. L. Souza³, Irwin R. A. Menezes², Jaime Ribeiro-Filho⁴, José G. M. Costa², Henrique D. M. Coutinho².

.

¹Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Regional do Cariri, Crato, Ceará – Brasil;

² Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri, Crato, Ceará – Brasil;

³ Universidade do Semi Árido, Mossoró, Rio Grande do Norte – Brasil; Faculdade Leão Sampaio, Juazeiro do Norte, Ceará – Brasil⁴.

* Correspondência: Maria Flaviana B. Morais-Braga

Universidade Regional do Cariri, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Ciências Biológicas, laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Av. Cel. Antonio Luiz, 1161. Pimenta. Crato - CE. Brasil. CEP:63105-000. Fone: +55(88)31021212; Fax: +55(88)31021291; e-mail: flavianamoraisb@yahoo.com.br

RESUMO

Combinações terapêuticas são cada vez mais ocorrentes no contexto da resistência fúngica. Produtos naturais têm sido avaliados em associação com fármacos na busca de novos constituintes que possam agir em conjunto contra leveduras do gênero *Candida*. O objetivo desse trabalho foi avaliar a composição química dos extratos aquosos e hidroetanólicos das espécies *Psidium brownianum* Mart ex DC. e *Psidium guajava* L. e seu potencial para modificar a ação do fluconazol frente a linhagens de *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. Os testes foram realizados pelo método de microdiluição em caldo, onde a leitura de placas foi realizada por espectrofotometria, gerando curva de viabilidade celular e IC₅₀ dos extratos frente às leveduras. Prospecção química dos extratos foi realizada para detectar presença de

metabólitos secundários. Fenóis totais foram quantificados. A comparação da composição fenólica dos extratos foi realizada. Fluconazol e extratos mostraram individualmente alta Concentração Inibitória Mínima. Os extratos (CIM / 16) em combinação com o fluconazol apresentaram relações sinérgicas variando em grau. *P. brownianum* apresentou sinergismo com o fluconazol contra todas as linhagens. O efeito sinérgico de extratos de *P. guajava* com o fluconazol foi mais evidente contra as linhagens CA LM 77 e CT INCQS 400042. A CI_{50} do fluconazol foi obtida variando de 19,22 a 68,10 g / mL e a dos produtos combinados variou entre 2,20 e 45,40 μ g / mL. A prospecção química revelou a presença de fenóis, flavonoides e taninos. A quantidade total de fenóis para extratos foi estabelecida, tendo sido encontrados em concentrações que variaram entre 49,25 e 80,77 GAE/g (*P. brownianum*) e de 68,07-82,18 GAE/g (*P. guajava*). Ambas as plantas apresentam semelhança química e podem ser usadas para aumentar o efeito do fluconazol, sendo uma possível fonte de novas formulações farmacêuticas contra estes agentes infecciosos.

Palavras-chave: Fitoquímica, modulação, Gênero *Psidium*, leveduras.

1. Introdução

A saúde humana vem sendo constantemente abalada pela ocorrência de infecções causadas por micro-organismos resistentes a agentes terapêuticos. A evolução destes micro-organismos, particularmente de fungos do gênero *Candida*, tem ocasionado resistência a uma série de antifúngicos, impulsionando novas buscas por medicamentos eficazes [1-2].

A Organização Mundial da Saúde [3] chama a atenção para a importância de epidemias de infecções fúngicas, especialmente, as causadas por espécies do gênero *Candida*, consideradas as mais comuns. Candidíases superficiais e invasivas tem acometido especialmente populações vulneráveis, com necessidades de tratamentos de saúde prolongados, de Unidades de Terapia Intensiva (UTI) e com alterações no sistema imunológico. Os tratamentos disponibilizados apresentam limitações de opções terapêuticas, com apenas três classes de agentes antifúngicos (os azoles, as equinocandinas e os polienos), sendo que em alguns países em desenvolvimento apenas uma das classes está disponível, devido à falta de recursos. Vários países registraram resistência para antifúngicos e esta resistência vem crescendo especialmente entre as espécies não-*albicans*. Além disso,

medicamentos utilizados na terapia possuem efeitos tóxicos. Tais fatos, portanto, justificam a necessidade de pesquisas voltadas para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.

Terapias por associação de drogas é uma prática que data de muitos anos. A combinação de plantas por meio de formulações caseiras tem composto terapias em diversas localidades para os mais variados tipos de enfermidades [4,5]. Além disso, em algumas populações, mesmo contrariando a vigilância farmacológica, as pessoas costumam usar plantas medicinais em concomitância com fármacos [6]. Combinação de fármacos comerciais entre si também tem sido frequente, uma vez que se deseja aliar a efetividade sinérgica, obtida pela associação das drogas, com o benefício econômico de poder contar com uma associação de produtos previamente industrializados [7].

Nesta busca por novas alternativas medicamentosas, outro tipo de associação tem despontado: a combinação entre produtos naturais e fármacos comerciais [8-9]. Tendo como princípio norteador o fato de que formulações medicinais à base de plantas são utilizadas como complemento e reforço no tratamento de uma determinada enfermidade, estes produtos naturais, na forma de extratos e frações, têm sido testados para a atividade antimicrobiana em conjunto com fármacos comerciais [10] com interessantes resultados, vislumbrando em longo prazo, após estudos e aplicações, novas possibilidades terapêuticas por meio de interações medicamentosas benéficas desejáveis.

Neste trabalho, as espécies *Psidium brownianum* e *Psidium guajava* foram ensaiadas em teste antimicrobiano *in vitro* com o objetivo de verificar se apresentam potencial sinérgico quando associadas ao antifúngico comercial fluconazol contra linhagens de leveduras do gênero *Candida*.

2. Material e Métodos

2.1. Área de coleta

A área na qual foi coletada a espécie *P. brownianum* está localizada na Fazenda Barreiro Grande, município do Crato, em área de cerrado *stricto sensu*, a nordeste da Chapada do Araripe (latitude: 07 ° 21.685' S e longitude: 39 ° 28.605' W, 907m de altitude), no município de Crato, Ceará, Nordeste do Brasil. A espécie *P. guajava* foi coletada em propriedade particular denominada Sítio Malhada, área de caatinga, na zona rural do município de Milagres, Ceará, Nordeste do Brasil (latitude: 07° 17.119' S e longitude: 038°

51.779' W, 388 m de altitude; latitude: 07° 17.120' S e longitude: 038° 51.778' W, 389 m de altitude; latitude: 07° 17.122' S e longitude: 038° 51.776' W, 392 m de altitude; latitude: 07° 17.119' S e longitude: 038° 51.779' W, 388 m de altitude).

2.2. *Material vegetal*

Folhas jovens e saudáveis das espécies *P. guajava* e *P. brownianum* foram coletadas e transportadas ao Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular da Universidade regional do Cariri – URCA. Exsiccatas das espécies foram produzidas e depositadas no Herbário Dárdano de Andrade Lima desta Universidade sob os números 10.161 (*P. brownianum*) e 10.935 (*P. guajava*). As coletas foram realizadas entre os meses de janeiro e abril, meses chuvosos, durante a manhã entre 8h30min e 10h30min. Foi feito triagem e limpeza do material vegetal antes de ser pesado e armazenado sob refrigeração. Ao todo foram pesados 2.866 g de folhas de *P. brownianum* e 2.650 g de folhas da espécie *P. guajava* e este quantitativo foi dividido para preparação de três tipos de extratos: extrato hidroetanólico (70%), extrato aquoso por decocção e extrato aquoso por infusão.

2.3. *Preparação dos extratos*

Extratos aquosos: foram preparados dois tipos de extratos aquosos e para cada um foram utilizados 399,9 g de folhas misturados a seis litros de água (tendo com base a proporção 10g/150 mL, o equivale a uma xícara de chá – 150 mL). A decocção foi feita misturando as folhas, grosseiramente cortadas, em água fria e depois as colocando para ferver por 15 min. Após este período, o chá foi colocado para esfriar, sendo em seguida filtrado e armazenado sob refrigeração. Já para a infusão, a água foi levada à ebulição sem as folhas, sendo estas colocadas na água após ter sido apagado o fogo. A panela foi abafada com tampa e as folhas lá permaneceram até o chá esfriar [11], sendo a preparação filtrada em seguida e depois armazenada, também sob refrigeração. Tanto o infuso quanto o decocção foram congelados e levados ao liofilizador (-60 ° C) até que fosse retirada toda a água. Os extratos em pó foram armazenados para testes sob refrigeração. Foram obtidos após liofilização 24,9 g de Extrato Aquoso de *P. brownianum* Decocção (EAPBD), 23,3 g de Extrato Aquoso de *P. brownianum* Infuso (EAPBI), 14,46 g de Extrato Aquoso de *P. guajava* Decocção (EAPGD) e 15 g de Extrato Aquoso de *P. guajava* Infuso (EAPGI).

Extrato hidroetanólico. O extrato hidroetanólico (70%) foi preparado por maceração com extração a frio, usando-se um total de 1.846,5 g de folhas de *P. guajava* e de 2.000 g de folhas de *P. brownianum*, na proporção de 5 g de folhas para cada mL da solução hidroetanólica [11]. As folhas foram cortadas para que fosse aumentada a superfície de contato com o extrator e a mistura foi deixada em temperatura ambiente protegido do ar e da luz, por um período de 96 horas para que fosse aumentada a eficiência da extração. O macerado foi, em seguida, filtrado e levado a evaporador rotativo (Q-344B – Quimis – Brasil) 40 rpm a 60° C, para concentração do extrato. Ainda contendo água, os extratos brutos foram congelados e depois liofilizados tendo sido obtidos 50,8 g de Extrato Hidroetanólico de *P. guajava* (EHPG) e 568 g de Extrato Hidroetanólico de *P. brownianum* (EHPB) que em seguida foram armazenados sob refrigeração.

2.4. Análise química

2.4.1. Prospecção química qualitativa

Os ensaios químicos foram realizados para a análise qualitativa da presença de metabólitos secundários. Os testes de detecção para avaliar a presença de taninos, fenóis, flavonóides e alcalóides foram feitos de acordo com o método descrito por Matos [12]. Os ensaios baseiam-se na observação visual da cor e a formação de modificações de precipitado após a adição de reagentes específicos.

2.4.2. Quantificação de fenóis totais

Foram pesados 0,01g dos extratos e em seguida diluídos em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Uma solução mãe (1.000 µg/mL) foi preparada diluindo-se os extratos em água. A partir desta, outras concentrações foram preparadas e utilizadas no teste (500, 400, 200, 100, 50, 25 e 10 µg/mL). Foram distribuídos 100 µL de cada amostra para tubos de ensaios e nestes foram adicionados 50 µL de Foulín-Ciocalteu, 2.000 µL de carbonato de cálcio e 7.850 µL de água. O branco continha Foulín-Ciocalteu, carbonato de cálcio e água. Para a curva de calibração com ácido gálico foram preparadas diferentes concentrações do composto (200, 100, 50, 25, 10 e 5 µg/mL). A leitura foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 750 nm. O teste foi realizado em triplicata [13, com algumas modificações].

2.4.3. *Análise estatística da quantificação de fenóis totais*

A quantificação de fenóis foi mensurada por interpolação através da faixa linear da curva padrão e os valores estão expressos como (EAG)/g: equivalente de ácido gálico por grama.

2.4.4. *Análise comparativa da composição fenólica*

A composição fenólica foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC-DAD de acordo com Kamdem [14] e Silva [15], com modificações. Os dados cromatográficos e tabelas estão disponíveis em Moraes-Braga et al. [16-17].

2.5. *Ensaio antifúngicos*

2.5.1. *Meios de cultura e linhagens utilizadas*

Foram utilizadas linhagens dos tipos padrão, obtidas da Coleção de Culturas Oswaldo Cruz do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) e isolados clínicos de leveduras de *Candida albicans* e *Candida tropicalis* cedidas pela Dra. Edeltrudes Oliveira Lima (Laboratório de Micologia da Universidade Federal da Paraíba), a saber: CA INCQS 40006, CA LM 77, CT INCQS 40042 e CT LM 23. Estas linh

agens foram inoculadas em meio Agar Sabouraud Dextrose (ASD – KASVI) e levadas à incubação por 24 horas a 37 °C. Utilizando-se a escala de McFarland, a concentração dos inóculos foi padronizada comparando-se a turbidez dos mesmos com o padrão 0,5 da escala. Os inóculos, assim preparados, foram utilizados nos testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e no teste para verificação do potencial modificador da ação de antifúngicos comerciais. Para realização dos testes, utilizou-se o meio de cultura *Sabouraud Dextrose Broth* (CSD - HIMEDIA), duplamente concentrado.

2.5.2. *Drogas e reagentes e preparo de solução*

O dimetilsulfóxido (DMSO - Merck, Darmstadt, Alemanha) foi usado para diluição dos extratos e o antifúngico fluconazol (cápsula - FLUCOMED), diluído em água, foi

utilizado como droga de referência para os testes. As soluções matrizes dos extratos foram preparadas pesando 0,3 g de cada extrato e, em seguida, diluindo-os em 1 mL de DMSO. Com a finalidade de obter a concentração desejada para realização dos testes, os extratos sofreram nova diluição, em água destilada e estéril, de forma que a concentração de DMSO nos produtos naturais não exercesse qualquer atividade nas células testadas.

2.5.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Este teste foi realizado pelo método da microdiluição em caldo, em placas de 96 poços, conforme Javadpour et al. [18]. Um processo de diluição seriada foi realizado e as concentrações dos produtos naturais e do fluconazol variaram de 8.192 µg/mL a 64 µg/mL. O último poço foi usado como controle de crescimento dos micro-organismos. Controles de diluição dos produtos (utilizando salina ao invés de inóculo) e de esterilidade do meio também foram realizados. Todos os testes foram realizados em triplicata. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas e após este período procedeu-se a leitura em aparelho de espectrofotometria de ELISA (Termoplate®) com comprimento de onda de 630 nm. A CIM foi definida como a concentração na qual se observou acentuada redução na curva de crescimento fúngico nas concentrações testadas.

2.5.4. Verificação do potencial modificador da ação de antifúngicos comerciais

Para realização do teste utilizou-se o produto natural em concentração subinibitória (CIM/16) e, de acordo com a metodologia utilizada por Coutinho et al. [19], com pequenas modificações, a droga comercial (fluconazol), foi utilizada no teste de combinação de drogas em diluição seriada nas concentrações que variaram de 1 a 1.024 µg/mL. Foi realizado o controle de diluição do teste de combinação de drogas e a CIM do fluconazol também foi determinada, sendo necessário realizar o controle de diluição do mesmo. Um controle de esterilidade de meio foi preparado. Todo o teste foi realizado em triplicata e as placas foram incubadas a uma temperatura de 37 °C por 24 horas. A leitura foi realizada em aparelho de espectrofotometria de ELISA (Termoplate®) com comprimento de onda de 630 nm e os resultados foram utilizados para obtenção de uma curva de viabilidade celular.

2.5.5. Análise estatística dos ensaios microbiológicos

Os resultados dos ensaios foram disponibilizados em triplicata. Os dados obtidos para cada concentração de amostra foram verificados quanto à sua distribuição normal e, em seguida, analisadas por ANOVA de uma via e posteriormente por meio do teste de Tukey. Os valores de IC₅₀ foram obtidos por regressão não linear para interpolação de valores a partir de curvas padrão (usando o software Graphpad Prism, v. 5.0) e os valores de percentual (%) de crescimento e a concentração de valores de IC₅₀ estão expressos em µg / mL.

3. Resultados

A prospecção química realizada revelou que todos os extratos apresentam metabólitos secundários como fenóis, flavonoides e taninos (Tabela 1). A análise química para determinação de fenóis totais revelou que os extratos de *P. guajava* e *P. brownianum* apresentam quantitativos consideráveis destes compostos (Tabela 2). A análise por HPLC traz a especificação de alguns compostos, determinados como parâmetros, presentes nos extratos cuja composição majoritária varia em concentração [16-17] de acordo com o observado na Tabela 3. De acordo com a análise por HPLC, ambos os extratos possuem composição semelhante, variando apenas na concentração dos compostos fenólicos detectados.

Os extratos de *P. guajava* apresentaram os níveis mais altos de compostos fenólicos com diferenças significativas entre as concentrações de ácido clorogênico, quercitrina, quercetina e luteolina. Na decocção foram observadas significativas diferenças entre catequinas, ácido cafeico, quercetina, campferol e luteolina. Em relação à infusão, todos os compostos apresentam diferença quantitativa, com exceção de luteolina, quercetina, catequina e rutina (Figura1).

Diante do investigado, estas duas espécies do gênero *Psidium* são quimicamente semelhantes e isto pode ser verificado tanto nos resultados da análise por HPLC - ao ser constatado que as duas espécies possuem os mesmos compostos majoritários [16-17]: quercetina e luteolina (Tabela 3), quanto na prospecção química, na qual foram encontrados os mesmos metabólitos para ambas as espécies, assim como também na quantificação de fenóis totais, com exceção dos extratos hidroetanólicos das espécies que exibiram teores diferenciados.

No teste para determinação da Concentração Inibitória Mínima os extratos de ambas as espécies tiveram efeito sobre linhagens fúngicas de *Candida* em elevadas concentrações com CIM de 8.192 µg/mL, visualizadas por espectrofotometria. As linhagens utilizadas no ensaio para verificação do potencial modificador da ação do antifúngico mostraram-se resistentes ao fluconazol. A combinação deste fármaco com os extratos aquosos e hidroetanólico em concentração subinibitória possibilitou, na maioria dos resultados, a inibição dos micro-organismos em concentrações mais baixas do fluconazol sendo possível verificar este efeito sinérgico por meio de curva de viabilidade celular (Figuras 2 e 3). Através da IC₅₀ (Tabela 4) dos produtos avaliados, podemos verificar que todos os extratos da espécie *P. brownianum* em combinação apresentaram concentrações muito baixas quando comparadas à obtida para o fluconazol sozinho. Extratos de ambas species potencializaram a ação antifúngica do fluconazol contra linhagens de leveduras de CA LM 77, CT INCQS 40042 and CT LM 23 (Figura 2).

Tabela 1.

Prospecção fitoquímica dos extratos de *Psidium guajava* e *Psidium brownianum*.

Extratos	Metabólitos													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
HEPG	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
HEPB	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
AEPGD	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
AEPBD	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
AEPGI	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
AEPBI	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-

1 – Fenóis; 2 – Taninos pirogálicos; 3 – Taninos flobabênicos; 4 – Antocianinas; 5 – Leucoantocianidinas; 6 – Flavonas; 7 – Flavonóis; 8 – Flavononóis; 9 – Flavononas; 10 – Xantonas; 11 – Auronas; 12 – Chalconas; 13 – Catequinas; 14 – Alcaloides; (+) presença; (-) ausência; EHPG: Extrato Hidroetanólico de *P. guajava*; EAPGD: Extrato Aquoso de *P. guajava* Decocção; EAPGI: Extrato Aquoso de *P. guajava* Infusão; EHPB: Extrato Hidroetanólico de *P. brownianum*; EAPBD: Extrato Aquoso de *P. brownianum* Decocção; EAPBI: Extrato Aquoso de *P. brownianum* Infusão.

Tabela 2.

Quantificação de fenóis totais nos extratos de *Psidium guajava* e *Psidium brownianum*

Espécie	Extratos (EAG)/g		
	Hidroetanólico	Aquoso por decocção	Aquoso por infusão
<i>P. guajava</i>	82,18	78,14	68,07
<i>P. brownianum</i>	49,25	80,77	77,74

(EAG)/g: equivalente de ácido gálico por grama.

Tabela 3.Compostos fenólicos majoritários de *Psidium guajava* e *Psidium brownianum* (HPLC-DAD).

	Extratos					
	EHPG	EHPB	EAPGD	EAPBD	EAPGI	EAPBI
Compostos Majoritários	Quercetina	Quercetina	Quercetina	Luteolina	Quercetrina Isoquercetrina Luteolina	Luteolina

EHPG: Extrato Hidroetanólico de *P. guajava*; EAPGD: Extrato Aquoso de *P. guajava* Decocção; EAPGI: Extrato Aquoso de *P. guajava* Infusão; EHPB: Extrato Hidroetanólico de *P. brownianum*; EAPBD: Extrato Aquoso de *P. brownianum* Decocção; EAPBI: Extrato Aquoso de *P. brownianum* Infusão.

Tabela 4.

CI₅₀ dos extratos de *Psidium guajava* e *Psidium brownianum* em combinação com o fluconazol frente a linhagens de *Candida* (µg/mL)

Produtos testados	Linhagens			
	CA INCQS 40006	CA LM 77	CT INCQS 40042	CT LM 23
Fluconazol (FCZ)	19,22	32,41	68,10	45,40
EHPG + FCZ	8,77	3,82	15,24	12,68
EHPB + FCZ	8,30	3,78	3,10	10,20
EAPGD + FCZ	25,89	7,88	37,52	13,66
EAPBD + FCZ	11,16	2,28	12,12	8,16
EAPGI + FCZ	3,88	3,88	6,17	41,11
EAPBI + FCZ	3,20	2,05	4,45	6,94

EHPG: Extrato Hidroetanólico de *P. guajava*; EHPB: Extrato Hidroetanólico de *P. brownianum*; EAPGD: Extrato Aquoso de *P. guajava* Decocção; EAPBD: Extrato Aquoso de *P. brownianum* Decocção; EAPGI: Extrato Aquoso de *P. guajava* Infusão; EAPBI: Extrato Aquoso de *P. brownianum* Infusão; CA: *Candida albicans*; CT: *Candida tropicalis*; INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; LM: Laboratório de Micologia.

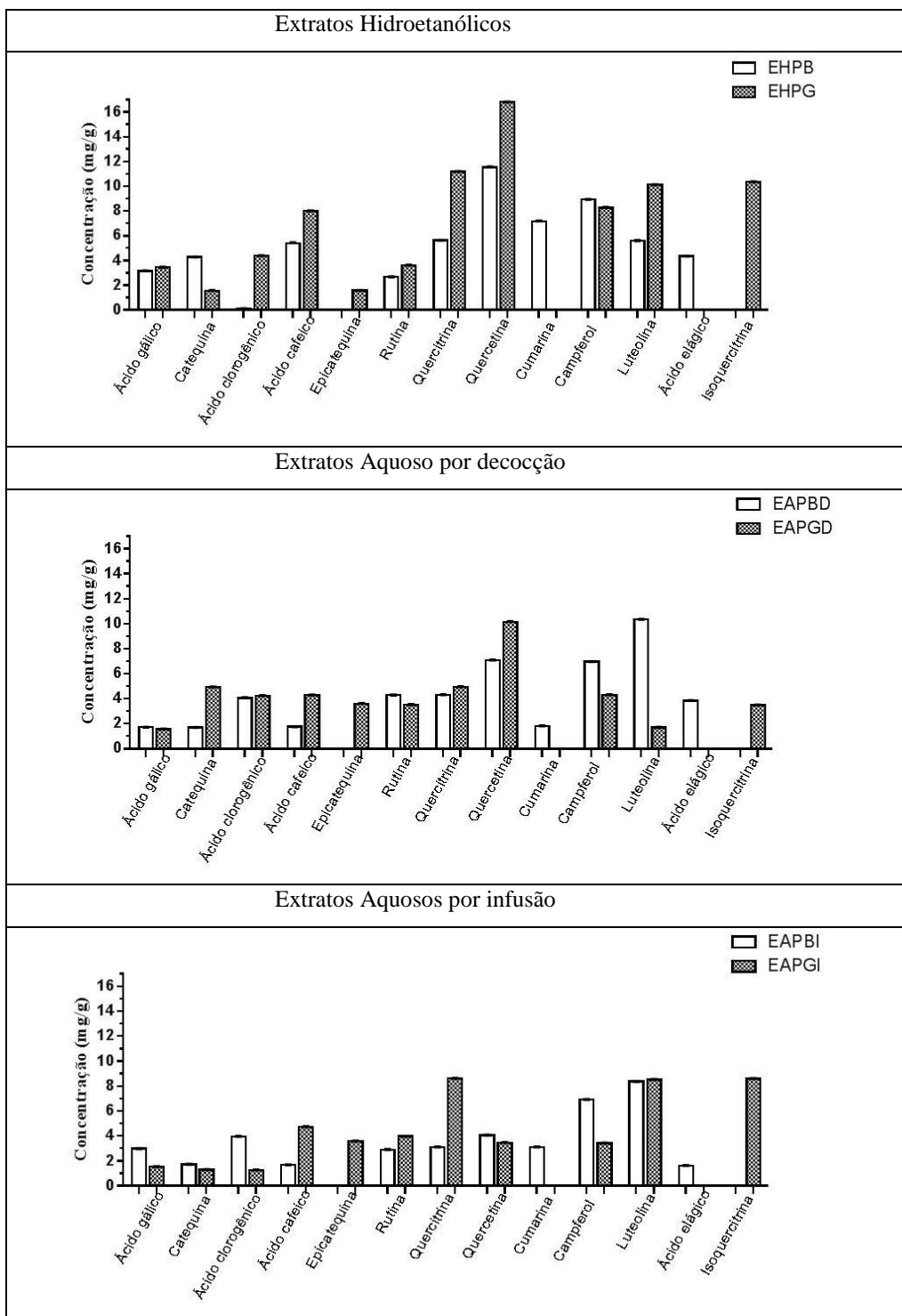


Fig. 1. Comparação da quantidade de compostos fenólicos encontrados em extratos aquosos e hidroetanólicos de *Psidium guajava* e *Psidium brownianum*. Compostos investigados nos extratos: ácido gálico, catequina, ácido clorogênico, ácido cafeico, epicatequina, rutina, quercitrina, isoquercitrina, quercetina, caempferol e luteolina (*P. guajava*) e ácido gálico, catequina, ácido clorogênico, ácido cafeico, o ácido elágico, rutina, quercitrina, quercetina, cumarina, caempferol e luteolina (*P. brownianum*).

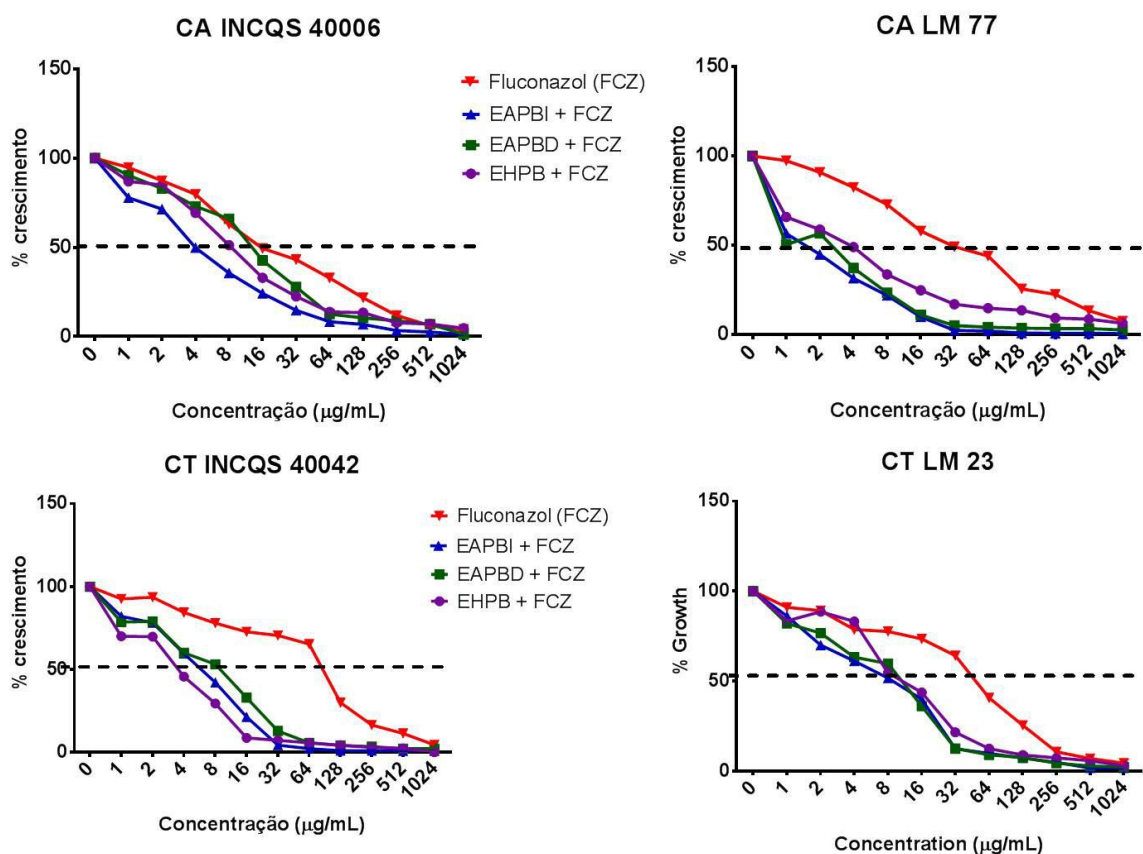


Fig. 2. Efeito antifúngico do fluconazol sozinho e em combinação com os extratos de *Psidium brownianum* (CIM/16 µg/mL). FCZ: Fluconazol; CA: *Candida albicans*; CT: *Candida tropicalis*; INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; LM: Laboratório de Micologia. EAPBI: Extrato Aquoso de *P. brownianum* Infusão; EAPBD: Extrato Aquoso de *P. brownianum* Decocção; Extrato Hidroetanólico de *P. brownianum* EHPB.

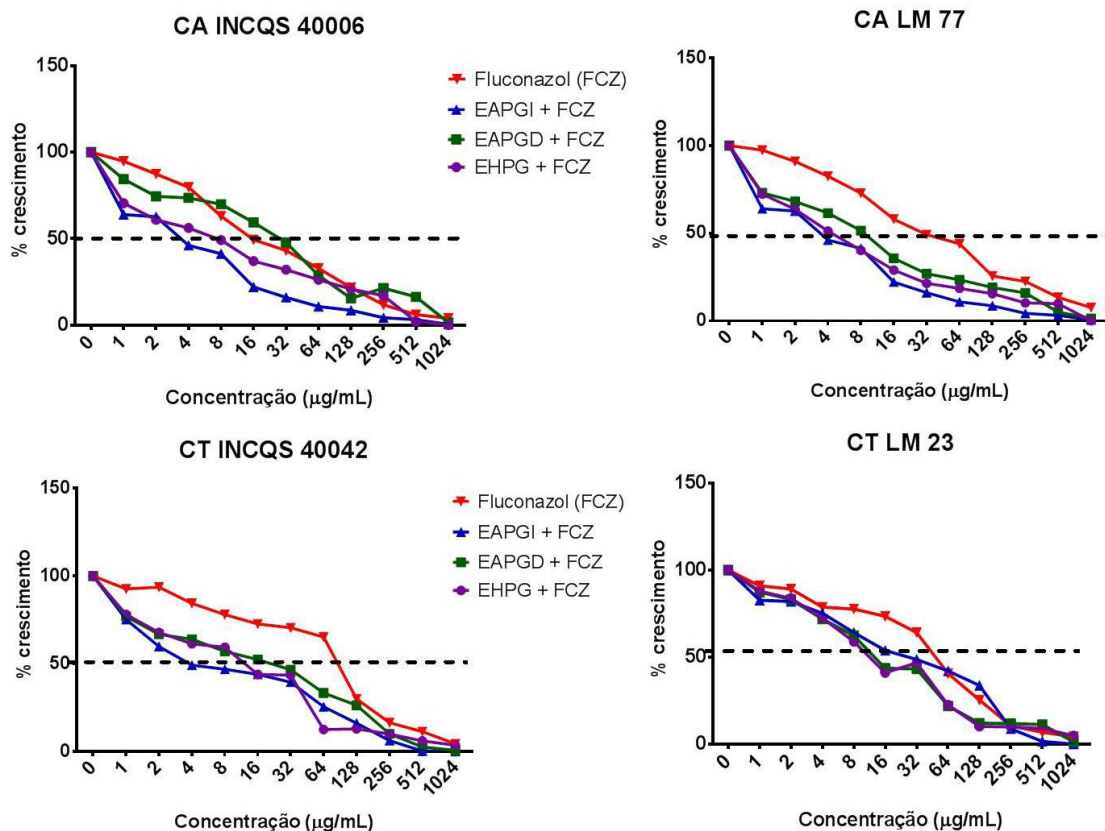


Fig. 3. Efeito antifúngico do fluconazol sozinho e em combinação com os extratos de *Psidium guajava* (CIM/16 µg/mL). FCZ: Fluconazol; CA: *Candida albicans*; CT: *Candida tropicalis*; INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; LM: Laboratório de Micologia. EAPBI: Extrato Aquoso de *P. guajava* Infusão; EAPBD: Extrato Aquoso de *P. guajava* Decocção; EHPB: Hidroetanólico Extrato de *P. guajava*.

4. Discussão

O fluconazol é um antifúngico de ação fungistática, capaz de desestabilizar a membrana fúngica por meio da inibição de azol-desmetilase do lanosterol 14α , produto do gene de *ERG11*, uma enzima citocromo P450 essencial na via biossintética do ergosterol [20]. Resistência de leveduras de *Candida* ao fluconazol tem sido relatada em alguns trabalhos [21-22] e por conta disso, tentativas de potencializar o efeito deste fármaco por meio de interações sinérgicas são ensaiadas com outros fármacos comerciais frente a isolados clínicos resistentes. Spitzer e colaboradores [10], por exemplo, avaliaram diversas combinações visando o aproveitamento sistemático de fármacos e acabaram por identificar 148 medicamentos, de potencial antifúngico desconhecido, que potencializaram o efeito do fluconazol, demonstrando surpreendentemente, em alguns casos, uma ação fungicida potente. Bancos de dados de combinação de fármacos têm sido criados, sendo o Antifungal Synergistic Drug

Combination Database (ASDCD) um deles, onde o fluconazol é encontrado em sinergismo com até 42 medicamentos para tratamento antifúngico [7].

Algumas pesquisas também têm abordado interações entre produtos naturais e fluconazol. No trabalho de Noudoshan e colaboradores [23] o extrato aquoso do alho (*Allium sativum*), avaliado em associação com o fluconazol contra isolados clínicos de diferentes espécies de *Candida*, demonstrou efeito potencializador da ação do fármaco, tendo sido sugerido para fins terapêuticos o uso tópico dos dois agentes antimicrobianos. Mais tarde, o componente bioativo do alho, alicina, de fraca atividade individual, foi investigado quanto a seu potencial sinérgico, demonstrando sinergismo com o fluconazol contra 23 linhagens resistentes a estes. E ainda neste trabalho, resultados interessantes também foram observados em testes *in vivo* [24]. Uma investigação sobre o efeito combinado de óleos essenciais de plantas medicinais (*Thymus broussonetii* e *T. maroccanus*) e fármacos comerciais, entre estes o fluconazol, revelou forte sinergismo e Saad e colaboradores [25], tendo como base os resultados de seus trabalhos, destacaram benefícios que poderiam surgir através da terapia por combinação de agentes, como a redução da dose mínima eficaz de medicamentos, redução de efeito tóxico e, conseqüentemente, de efeitos colaterais, além de baixo custo no tratamento.

Compostos fenólicos em associação com o fluconazol também exibiram interação sinérgica. Pode-se citar o caso do ácido cafeico, cuja série de amidas foram investigadas quanto ao potencial sinérgico com fluconazol [26], verificando-se que esta associação pode sensibilizar fungos resistentes ao fármaco, diminuindo a CIM₈₀ de fluconazol de 128,0 µg/mL de 1,0-0,5 µg/mL contra *C. albicans*. Catequinas potencializaram o efeito do fluconazol reduzindo significativamente sua concentração de efeito frente a *C. albicans* [27]. O sinergismo de catequinas e quercetina com o fluconazol foi avaliado utilizando linhagens de *C. tropicalis* resistentes ao fluconazol, sendo constatado que a associação dos flavonóides com o fármaco desencadeou apoptose celular, despolimerização mitocondrial, acumulação de ROS (reactive oxygen species) e danos ao DNA [28].

Compostos fenólicos como ácido gálico, catequina, luteolina e quercetina apresentaram atividade antifúngica *in vitro* contra diferentes espécies de *Candida*, entre elas *C. albicans* e *C. tropicalis* [29] e a atividade anticandida de ácido cafeico e suas amidas foi verificada por Fu et al. [30]. Um ensaio demonstrou que o ácido clorogênico foi capaz de exercer efeito sobre a *Candida albicans* por perturbação da bicamada lipídica de sua membrana [31]. Bisignano et al. [32] verificou atividade antifúngica frente a *Candida albicans* para os compostos ácido gálico, kaempferol e rutina, sendo o melhor efeito exercido

pelo primeiro. Cumarinas também apresentam efetividade contra linhagens de *Candida*, afetando eventos celulares que quando interrompidos tem como consequência a perturbação e perda da integridade da membrana celular [33] e isoquercitrina exerce o seu efeito fungicida por perturbação da membrana das células [34]. A tabela 5 demonstra que todos os componentes detectados nas plantas estudadas apresentam potencial anti-fúngico.

Tabela 5.

Compostos fenólicos com atividade contra *Candida* spp.

Compostos	Referências
Ácido gálico	[29-32-37-38-39-40]
Rutina	[32-37]
Ácido clorogênico	[31-39]
Ácido elágico	[40-41]
Ácido cafeico	[30-39]
Catequina	[29- 42]
Epicatequina	[40-42]
Quercetina	[29-38-39- 43]
Quercitrina	[38-43]
Isoquercitrina	[34]
Cumarina	[33-44]
Campferol	[32-40-43]
Luteolina	[29-43]

Este é o primeiro relato do potencial modificador da ação de um antifúngico comercial por extratos de *P. guajava* e *P. brownianum*. Entre os constituintes identificados para os extratos das plantas podemos encontrar os compostos citados acima e em relação à atividade modificadora da ação de fármaco, acredita-se que estejam agindo conjuntamente com o fluconazol para melhorar o seu efeito, em concentrações mais baixas, favorecendo a desestruturação da membrana fúngica, tornando-a mais permeável à penetração do antifúngico. Entretanto, como se trata de extratos que são misturas complexas de substâncias, alguns constituintes que naturalmente teriam maior efeito potencializador de fluconazol isoladamente, podem promover interações antagônicas com outros fitoconstituintes com os quais interagem na mistura e, assim, perderem parte desse potencial maximizador. O presente estudo investigou a presença de alguns compostos fenólicos presentes nos extratos. No entanto, muitos outros constituintes que mostram efeitos biológicos significativos cuja

presença ainda é desconhecida na espécie *P. brownianum*, ao passo que é relativamente bem relatado em *Psidium guajava*, podem ser encontrados [35-36].

5. Conclusão

Extratos hidroetanólicos e aquosos de *P. brownianum* e *P. guajava* apresentam capacidade de modificar a ação do fluconazol, podendo potencializar ou diminuir o seu efeito frente a linhagens de *C. tropicalis* e *C. albicans*. Os extratos apresentam em sua composição compostos fenólicos e flavonóides de reconhecido efeito antifúngico que podem ter contribuído para o efeito sinérgico.

Agradecimentos

Os autores são gratos às agências brasileiras de Pesquisa: CNPq, CAPES e FUNCAP pelo apoio e suporte financeiro.

Declaração de conflito de interesse

Os autores declaram que não há conflito de interesses no que diz respeito à publicação deste artigo.

Referências

1. Cuenca-Estrella M. Antifungal drug resistance mechanisms in pathogenic fungi: from bench to bedside. *Clin Microbiol Infect.* 2014; 20 (s6): 54-59.
2. Köhler JR, Casadevall A, Perfect J. The spectrum of fungi that infects humans. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015; 5 (1): a019273.
3. World Health Organization. *Antimicrobial resistance: global report on surveillance.* World Health Organization, 2014.
4. Khan H. Medicinal Plants in Light of History Recognized Therapeutic Modality. *J Evid Based Complementary Altern Med.* 2014; 19 (3): 216-219.
5. Gurib-Fakim A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol Aspects Med.* 2006; 27 (1): 1-93.
6. Picking D, Younger N, Mitchell S, Delgoda R. The prevalence of herbal medicine home use and concomitant use with pharmaceutical medicines in Jamaica. *J Ethnopharmacol.* 2011; 137 (1), 305-311.
7. Chen X, et al. ASDCD: antifungal synergistic drug combination database. *PLoS One.* 2014; 9 (1): e86499.
8. Calixto Júnior JT, et al. Phytochemical analysis and modulation of antibiotic activity by *Luehea paniculata* Mart. & Zucc. (Malvaceae) in multiresistant clinical isolates of *Candida* Spp. *Biomed Res Int.* 2015; 2015.

9. Souza TM, Morais-Braga MF, Costa JG, Saraiva AA, Coutinho HD. Enhancement of antimicrobial activity of antibiotics and antifungals by the use of natural products from *Pityrogramma calomelanos* (L.) link. *Archives of Biological Sciences*, 2012; 64 (1): 43-48.
10. Spitzer M, et al. Cross-species discovery of syncretic drug combinations that potentiate the antifungal fluconazole. *Mol Syst Biol*. 2011; 7 (1): 499.
11. Matos FJA. *Living pharmacies*. 4th edn. Fortaleza: Publisher UFC, 2002 (Português).
12. Matos FJA. *Introduction to Experimental Phytochemical*. 3th edn. Fortaleza: Publisher UFC, 2009 (Português).
13. Ainsworth EA, Gillespie KM. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nat Protoc*. 2007; 2 (4), 875-877.
14. Kamdem JP, et al. *Trichilia catigua* (Catuaba) bark extract exerts neuroprotection against oxidative stress induced by different neurotoxic agents in rat hippocampal slices. *Ind Crops Prod*. 2013; 50 (2013): 625-632.
15. Silva ARH, et al. Biochemical and hematological effects of acute and sub-acute administration to ethyl acetate fraction from the stem bark *Scutia buxifolia* Reissek in mice. *J Ethnopharmacol*. 2014; 153 (3): 908-916.
16. Morais-Braga MFB, et al. Phenolic composition and medicinal usage of *Psidium guajava* Linn.: antifungal activity or inhibition of virulence? *Saudi J Biol Sci*. 2015a; DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.09.028>.
17. Morais-Braga MFB, et al. HPLC-DAD, fungistatic and anti-morphogenical analysis of extracts from *Psidium brownianum* Mart. Ex DC. against yeasts of the genus *Candida*. *Int J Food Prop*. 2015b; DOI: 10.1080/10942912.2015.1079786.
18. Javadpour MM, et al. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. *J Med Chem*. 1996; 39 (16): 3107–3113.
19. Coutinho HDM, Costa JGM, Lima EO, Falcão-Silva VS, Siqueira-Júnior JP. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and Chlorpromazine. *Chemotherapy*. 2008; 54 (4):328–330.
20. Groll AH, Lucca AJ, Walsh TJ. Emerging targets for the development of novel antifungal therapeutics. *Trends Microbiol*. 1998; 6 (3):117–124.
21. Fica, A. Tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas Primera parte: fluconazol, itraconazol y voriconazol. *Rev chilena infectol*. 2004; 21(1): 26-38.
22. Goel N, Gagneja D, Chaudhary U, Agarwal R. Fluconazole Resistance among *Candida* species Causing vulvovaginitis. *Res Rev J Microbiol Virol*. 2012; 2(2).
23. Nodoushan AJ, Dehghani M, Mirbagheri, SM. In vitro antifungal effect of aqueous Garlic (*Allium sativum*) extract and its combination with fluconazole against five common clinical *Candida* isolated from candidiasis lesions. *J Kerman Univ Med Sci*. 2007; 14 (3): 153-162.
24. Guo N, et al. In vitro and in vivo interactions between fluconazole and allicin against clinical isolates of fluconazole-resistant *Candida albicans* determined by alternative methods. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2010; 58 (2): 193-201.

25. Saad A, Fadli M, Bouaziz M, Benharref A, Mezrioui NE, Hassani L. Anticandidal activity of the essential oils of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* and their synergism with amphotericin B and fluconazol. *Phytomedicine*. 2010; 17 (13): 1057-1060.
26. Dai L, et al. Design, synthesis, and evaluation of caffeic acid amides as synergists to sensitize fluconazole-resistant *Candida albicans* to fluconazole. *Bioorg Med Chem Lett*. 2015; 25 (1): 34-37.
27. Hirasawa M, Takada K. Multiple effects of green tea catechin on the antifungal activity of antimycotics against *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother*. 2004; 53 (2): 225-229.
28. Silva CR, et al. Synergistic effect of the flavonoid catechin, quercetin, or epigallocatechin gallate with fluconazole induces apoptosis in *Candida tropicalis* resistant to fluconazole. *Antimicrob agents Chemother*. 2014; 58 (3): 1468-1478.
29. Alves CT, Ferreira IC, Barros L, Silva S, Azeredo J, Henriques M. Antifungal activity of phenolic compounds identified in flowers from North Eastern Portugal against *Candida* species. *Future microbiol*. 2014; 9 (2): 139-146.
30. Fu J, Cheng K, Zhang ZM, Fang RQ, Zhu HL. Synthesis, structure and structure–activity relationship analysis of caffeic acid amides as potential antimicrobials. *Eur J Med Chem*. 2010; 45 (6): 2638-2643.
31. Sung WS, Lee DG. Antifungal action of chlorogenic acid against pathogenic fungi, mediated by membrane disruption. *Pure Appl Chem*. 2010; 82 (1): 219-226.
32. Bisignano G, et al. Antimicrobial activity of *Mitracarpus scaber* extract and isolated constituents. *Let Appl Microbiol*. 2000; 30 (2): 105-108.
33. Thati B, et al. Mechanism of action of coumarin and silver (I)–coumarin complexes against the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Toxicol in vitro*. 2007; 21 (5): 801-808.
34. Yun J, Lee H, Ko HJ, Woo ER., Lee DG. Fungicidal effect of isoquercitrin via inducing membrane disturbance. *BBA-Biomembranes*. 2015; 1848 (2): 695-701.
35. Tambe R, Singhal RG, Bhise K, Kulkarni M. Phytochemical screening and HPTLC fingerprinting of leaf extracts of *Psidium guajava* Linn. *J Pharmacogn Phytochem*. 2014; 3 (1): 52-56.
36. Dakappa SS, Adhikari R, Timilsina SS, Sajjekhan S. A review on the medicinal plant *Psidium guajava* Linn.(Myrtaceae). *J Drug Deliv Therap*. 2013; 3 (2).
37. Rauha JP, et al. Antimicrobial effects of finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *Int J Food Microbiol*. 2000; 56 (1): 3-12.
38. Gehrke IT, et al. Antimicrobial activity of *Schinus lentiscifolius* (Anacardiaceae). *J ethnopharmacol*. 2013; 148 (2): 486-491.
39. Özçelik B, Kartal M, Orhan I. Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. *Pharm Biol*. 2011; 49 (4): 396-402.
40. Teodoro GR, et al. Antifungal activity of extracts and isolated compounds from *Buchenavia tomentosa* on *Candida albicans* and non-*albicans*. *Future microbial*. 2015; 10 (6): 917-927.
41. Li ZJ, Guo X, Dawuti G, Aibai S. Antifungal activity of ellagic acid *in vitro* and *in vivo*. *Phytother Res*. 2015; 29 (7): 1019-1025.
42. Hirasawa M, Takada K. Multiple effects of green tea catechin on the antifungal activity of antimycotics against *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother*. 2004; 53 (2): 225-229.

43. Salazar-Aranda R, Granados-Guzmán G, Pérez-Meseguer J, González GM, Torres NW. Activity of polyphenolic compounds against *Candida glabrata*. *Molecules*. 2015; 20 (10): 17903-17912.
44. Singh LK, Singh V, Katiyar D. Design, synthesis and biological evaluation of some new coumarin derivatives as potential antimicrobial agents. *Med Chem*. 2015; 11 (2): 128-134.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise química dos extratos apontou para a semelhança entre as espécies estudadas, onde ambas demonstraram o mesmo perfil fitoquímico, quantitativos aproximados de fenóis e constituintes fenólicos em comum, diferindo quanto aos quantitativos.

Do ponto de vista microbiológico, os extratos vegetais ensaiados não apresentaram efeito fungicida como sugerido pela literatura. Contudo, pode ser observado que os extratos potencializaram a ação do fluconazol e afetaram o dimorfismo fúngico, inibindo esse que é um dos principais fatores de virulência dos fungos do gênero *Candida*. Considerando-se o uso popular da espécie *P. guajava*, que é tópico, no volume de 150 mL equivalente a uma xícara de chá, seja de tintura, infusão ou decocção, há concentração dos produtos naturais suficiente para inibir tanto a proliferação quanto a transição morfológica dos fungos.

Quanto a *P. brownianum*, cujos relatos de uso medicinal contra doenças causadas por fungos são inexistentes, a avaliação que se faz da atividade de seus extratos é pautada exclusivamente nos preceitos farmacológicos, apresentando efeito similar ao encontrado para *P. guajava*. Efeito potencializador do fluconazol e inibidor da transição morfológica foram observados tanto contra *C. albicans* quanto contra *C. tropicalis*.

As espécies *P. guajava* e *P. brownianum* representam uma potencial fonte de metabólitos que podem ser utilizados em novas formulações farmacêuticas que visem a inibição da virulência *Candida*, principalmente em indivíduos com imunodepressão, que constituem o principal grupo susceptível à candidíase.

ANEXOS

ANEXO A - Comprovante de aceite para publicação em Saudi Journal of Biological Science

The screenshot shows an email client interface. On the left is a sidebar with folders: 'Escrever', 'Entrada (1)', 'Rascunhos (13)', 'Enviadas', 'Spam (72)', 'Lixeira (261)', 'Visualizações inteligentes' (with sub-folders: Não lido, Favorito, Pessoas, Social, Viagem, Compras, Finanças), 'Pastas', 'Recente', and 'Publicidade'. Below 'Publicidade' is an advertisement for a Motorola Razr D3 smartphone. The main area shows an email from 'Saudi Journal of Biological Sciences' received at 9:50 AM. The email content includes a reference number, the title of the accepted paper, a 'Dear Sir' salutation, a congratulatory message, and the signature of A S Alhomida, Editor-in-Chief.

Escrever

Apagar Mover Spam Mais

● Your Submission

● **Saudi Journal of Biological Sciences** Hoje em 9:50 AM

<ees.sjbs.0.341e86.631c66f4@eesmail.elsevier.com>
Para flavianamoraisb@yahoo.com.br

Ms. Ref. No.: SJBS-D-15-00727R1
Title: Phenolic composition and medicinal usage of Psidium guajava Linn .: antifungal activity or inhibition of virulence?
Saudi Journal of Biological Sciences

Dear Sir,


I am pleased to inform you that your paper "Phenolic composition and medicinal usage of Psidium guajava Linn .: antifungal activity or inhibition of virulence?" has been accepted for publication in Saudi Journal of Biological Sciences.

Thank you for submitting your work to Saudi Journal of Biological Sciences.

Yours sincerely,

A S Alhomida, Ph D
Editor-in-Chief
Saudi Journal of Biological Sciences

Publicidade



Motorola Razr D3
Cámara 8mp 2chips
O smartphone ideal

ANEXO B - Comprovante de publicação no periódico International Journal of Food Properties

The screenshot shows a web browser window displaying the article page for the International Journal of Food Properties. The browser's address bar shows the URL: www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10942912.2015.1079786. The page features a navigation menu on the left with options like 'View all volumes and issues', 'Current issue', and 'Submit'. The main content area includes the journal title, a 'Cover not available' notice, and the article title: 'Hplc-Dad, Fungistatic and Anti-Morphogenical Analysis of Extracts from *Psidium Brownianum* Mart. ex DC. Against Yeasts of the Genus *Candida*'. The authors listed are Maria Flaviana B. Moraes-Braga, Joara N. P. Cameiro, Antonio J. T. Machado, Débora L. Sales, Dara I. V. Brito, Rosimeire S. Albuquerque, Aline A. Boligon, Margareth L. Athayde, João T. Calixto Júnior, Djair S. L. Souza, Edeltrudes Oliveira Lima, Irwin R. A. Menezes, José G. M. Costa, Felipe S. Ferreira, and Henrique D. M. Coutinho. The article was received on 30 Mar 2015, accepted on 2 Aug 2015, and the accepted author version was posted online on 22 Mar 2016. On the right side, there are sections for '2014 Impact Factor: 0.915', a 'Sign in here' button, 'Article metrics' showing 'Views: 2', and promotional banners for 'Routledge Handbook of Forest Ecology' and 'Environment & Agriculture'.

International Journal of Food Properties

CrossMark
Cover not available

Psidium brownianum Mart. ex DC.
Hplc-Dad, Fungistatic and Anti-Morphogenical Analysis of Extracts from *Psidium Brownianum* Mart. ex DC. Against Yeasts of the Genus *Candida*

DOI: 10.1080/10942912.2015.1079786
Maria Flaviana B. Moraes-Braga^a, Joara N. P. Cameiro^a, Antonio J. T. Machado^a, Débora L. Sales^a, Dara I. V. Brito^b, Rosimeire S. Albuquerque^a, Aline A. Boligon^c, Margareth L. Athayde^d, João T. Calixto Júnior^d, Djair S. L. Souza^e, Edeltrudes Oliveira Lima^f, Irwin R. A. Menezes^b, José G. M. Costa^a, Felipe S. Ferreira^b & Henrique D. M. Coutinho^b
Publishing models and article dates explained
Received: 30 Mar 2015
Accepted: 2 Aug 2015
Accepted author version posted online: 22 Mar 2016

2014 Impact Factor: 0.915

Sign in here to start your access

Article metrics
Views: 2
Article metrics information

Routledge Handbook of Forest Ecology
Order Now

Environment & Agriculture
Connecting you to global environment & agriculture research
EXPLORE NOW!

ANEXO C - Comprovante de submissão ao periódico Microbial Pathogenesis



ANEXO D - Comprovante de submissão ao periódico Journal of Ethnopharmacology

The screenshot shows a web browser window displaying a Gmail inbox. The browser's address bar shows the URL <https://mail.google.com/mail/u/0/#inbox/151ec083196057e1>. The page header includes the URCA webMail logo and navigation icons. The main content area displays an email from the Journal of Ethnopharmacology, dated 29/12/15. The email subject is "A manuscript number has been assigned to your paper". The body of the email contains the following text:

Dear Dr. Bezerra Morais Braga,

Your submission entitled "Psidium guajava Linn., from ethnobiology to scientific validation: effect against microorganisms of clinical interest." has been assigned the following manuscript number: JEP-D-15-03620.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Elsevier Editorial as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/jep/>. Your username is flavianamoraib@yahoo.com.br. If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/JEP/automail_query.asp.

Thank you for submitting your work to this journal.

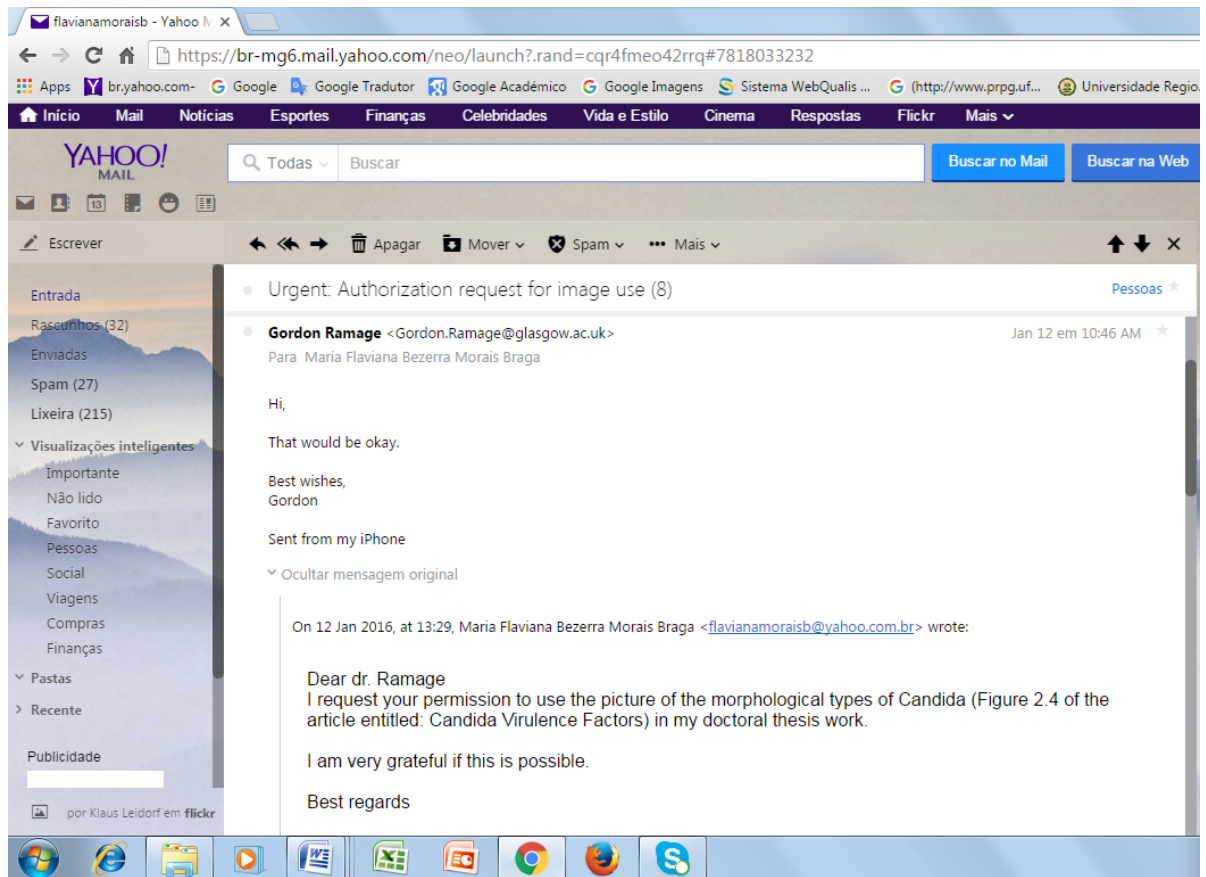
Kind regards,

Marianne Verberne, Ph.D.
Editorial Office
Journal of Ethnopharmacology

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

The screenshot also shows a Windows taskbar at the bottom with various application icons and a system tray displaying the time 06:57 and date 13/01/2016.

ANEXO E - Autorização para uso de imagem (Figura 3. Tipos celulares de *Candida*)



ANEXO F - Autorização para uso de imagem (Figura 4. Mecanismos de patogenicidade em *Candida albicans*)

