



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

HELLEN GOLDA MEIR FERREIRA GOLDENSTEIN

**EFEITO ANTIFÚNGICO DE EXTRATO DE *PSIDIUM GUAJAVA* SOBRE
CANDIDA ALBICANS POR FORMAS VEGETATIVAS E BIOFILME**

2018

HELLEN GOLDA MEIR FERREIRA GOLDENSTEIN

EFEITO ANTIFÚNGICO DE EXTRATO DE *PSIDIUM GUAJAVA* SOBRE *CANDIDA ALBICANS* POR FORMAS VEGETATIVAS E BIOFILME

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA E TECNOLOGIA APLICADA À ODONTOLOGIA.

Área: Inovação tecnológica multidisciplinar com ênfase em odontologia. Linha de pesquisa: Inovação tecnológica.

Orientador: Prof. Dr. Dimas Renó de Lima

São José dos Campos

2018

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2018]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Goldenstein, Hellen Golda Meir Ferreira

Efeito antifúngico de extrato de Psidium guajava sobre Candida albicans por formas vegetativas e biofilme / Hellen Golda Meir Ferreira Goldenstein.

- São José dos Campos : [s.n.], 2018.

53 f. : il.

Dissertação (Mestrado Profissional) - Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Aplicada à Odontologia - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2018.

Orientador: Dimas Renó de Lima.

1. Psidium guajava. 2. Candida albicans. 3. Doença periodontal. 4. Biofilme dentário. I. Lima, Dimas Renó de , orient. II. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. IV. Universidade Estadual Paulista (Unesp). V. Título.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Dimas Renó de Lima

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof^a.Dr^a. Luciene Reginato Chagas

Universidade Anhenbi Morumbi

Faculdade de Medicina

Campus de São José dos Campos

Prof. Adj. Dr. José Benedito de Oliveira Amorim

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 20 de Setembro de 2018.

DEDICATÓRIA

Primeiramente à Deus e Nossa Senhora. Sem ELÊS nada seria possível.

Aos meus pais Kátia e Sérgio, pelo carinho, amor e pulso firme pelo qual sempre me conduziram no caminho da verdade, seriedade e da cultura, me proporcionando, sem medir esforços e à todo custo e sacrifício uma educação de qualidade e os melhores valores que uma filha poderia aprender. À minha tia Graça, e ao meu irmão Israel por tudo o que vocês fizeram e fazem por mim diariamente. Foram vocês que me mostraram qual era o meu talento e me apoiaram nessa decisão ousada, árdua e muito feliz que eu tomei. AMO VOCÊS.

Ao meu marido Rodrigo, por estar sempre comigo, me apoiando nos momentos difíceis, sempre com paciência. Obrigada por entender a minha ausência algumas vezes e por sempre me oferecer ajuda. Amo você.

Aos meus avós maternos Amaro (in memorian), Lica, por estarem sempre presentes, me incentivando, na simplicidade, e me demonstrando o porque uma educação de qualidade, está nas coisas e nas pessoas mais simples que encontramos.

À minha avó paterna Mercedes, por todo o amor, carinho e incentivo que sempre me deu.

À minha sogra Célia por todo o carinho, que só uma mãe pode proporcionar para uma filha.

À minha tia Lília Maise, por dedicar o seu tempo e carinho para me ajudar com qualquer coisa que eu precisasse.

À Juliana, por todo o tempo e carinho em me ajudar com tudo e qualquer coisa que eu precisasse no meu trabalho.

À Sabrina, se uma coisa que a faculdade me ensinou foi fazer amigos, e eles ficam com você até o mestrado! MUITO OBRIGADA por tudo, sempre que precisar de qualquer coisa, eu estarei aqui, obrigada pelo seu carinho e amizade! Você é demais!

À todos os meus familiares e amigos que me proporcionaram, cada um à sua maneira um ensinamento diferente. Esse trabalho é para vocês!

AGRADECIMENTOS

*Primeiramente e sempre, à Deus e Nossa Senhora. Sem ELÆS nada seria possível.
Gostaria de agradecer ao Instituto de Ciência e Tecnologia da Unesp pela oportunidade
de fazer a Pós-graduação.*

*À Profa. Dra. Andrea Carvalho de Marco coordenadora do programa de Pós-graduação
mestrado profissional.*

*A todos os docentes desta Universidade com quem tive oportunidade de conhecer
participando deste programa*

*À equipe da Biblioteca pela ajuda na elaboração deste trabalho, contribuindo com o
acesso ao material bibliográfico e na orientação das normas.*

*À equipe da Secretaria de Pós-Graduação por toda ajuda e carinho que depositam em
todos os discentes.*

*À Prof^a Cristiane Yumi Koga Ito, por toda ajuda no desenvolvimento da parte
experimental, por ceder o laboratório para que eu pudesse desenvolver a minha pesquisa.*

*À Todos os alunos, professores e pesquisadores do Laboratório de Genomas. Vocês me
receberam com muito carinho e amor, me mostraram como realmente podemos aliar a pesquisa
ao que pode ser útil para a vida cotidiana. Obrigada a cada um de vocês!*

*Ao Professor Warley David Kerbauy por começar essa jornada comigo, como meu
orientador.*

*Ao Professor José B.O. Amorim, que me ajudou e me aconselhou muito durante todo o
curso. Meu mais sincero muito Obrigada!*

*Ao meu Orientador Prof. Dr. Dimas Renó de Lima, que me ajudou, apoiou e sempre fez
tudo o que podia para poder me ajudar na pesquisa. MUITO OBRIGADA, jamais irei esquecer
desse grande desafio para nós dois.*

*À todos os meus colegas e professores do curso de Mestrado Profissional, onde, cada um com
sua particularidade pode me proporcionar o maior e melhor crescimento pessoal e profissional.*

OBRIGADA.

"Nunca, jamais desanimeis, embora venham ventos contrários".

- Santa Paulina

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	9
RESUMO	10
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	10
2 PROPOSIÇÃO	13
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1 Preparação dos extratos.....	14
3.2 Diluição do extrato	16
3.3 Cultivo dos microrganismos	18
3.4 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	19
3.4.1 Preparação da microdiluição em caldo	20
3.5 Formação do biofilme	23
3.6 Aplicação do extrato de <i>P. guajava</i> no biofilme.....	25
3.7 Remoção do biofilme	27
3.8 Contagem de unidades formadoras de colônias	28
3.9 Análise estatística	31
4 RESULTADOS.....	32
4.1 Determinação da concentração inibitória mínima.....	32
4.1.2 Ação do extrato sob o biofilme	34
5 DISCUSSÃO	40
6 CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS.....	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma de preparação de <i>P.guajava</i>	15
Figura 2 - Diluição do extrato de <i>P.guajava</i>	16
Figura 3 - Extratos de <i>Psidium guajava</i>	17
Figura 4 - Inoculação de <i>C.albicans</i>	18
Figura 5 - Diluição do extrato.....	20
Figura 6 - Microplaca de 96 poços pronta para a realização da CIM de <i>C.albicans</i>	21
Figura 7 - Técnica de subcultivo.....	22
Figura 8 - Realização da técnica de subcultivo para determinação da CIM e CFM.....	22
Figura 9 - Formação do biofilme.....	24
Figura 10 - Aplicação do extrato sob o biofilme de 5 minutos.....	25
Figura 11 - Aplicação do extrato sob o biofilme de 24 horas.....	26
Figura 12 - Remoção do biofilme.....	27
Figura 13 - Contagem de UFC.....	29
Figura 14 - Realização da técnica da gota.....	30
Figura 15 - Técnica de subcultivo revelando a CIM para <i>C.albicans</i> indicada pela seta branca.....	32
Figura 16 - Gráfico de crescimento de UFC/ml do biofilme 24 horas após tratamento com extrato por 5 minutos.....	34
Figura 17 - Gráfico de crescimento de UFC/ml do biofilme 24 horas após tratamento com extrato por 24 horas.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Representação da microdiluição em placa com os valores das diferentes concentrações do extrato de <i>P. guajava</i> em mg/mL e concentração da CIM representada nas colunas em amarelo para <i>C. albicans</i>	33
Tabela 2 - Ação do extrato de <i>P.guajava</i> por 5 minutos sobre o biofilme de <i>C.albicans</i>	35
Tabela 3 - Efeito do Extrato sob o biofilme após plaqueamento da amostra, e exposição por 5 minutos do extrato sobre o biofilme.	36
Tabela 4 - Tabela 4 - Ação do extrato de <i>P.guajava</i> por 24 horas sobre o biofilme de <i>C.albicans</i>	38
Tabela 5 - Efeito do Extrato sob o biofilme após plaqueamento da amostra, e exposição por 24 horas do extrato sobre o biofilme.	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Colection
°C	Graus Celsius
<i>C.albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical Laboratory Standarts Institute
mg	Miligramma
mL	Mililitro
<i>P.aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>P.guajava</i>	<i>Psidium guajava</i>
SC	<i>Candida</i> Strains
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
µL	Microlitro
λ	Lambda – Unidade de comprimento de onda

Goldenstein HGMF. Efeito antifúngico de extrato de psidium guajava sobre candida albicans por formas vegetativas e biofilme [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2018.

RESUMO

A doença periodontal é um doença infecto-inflamatória e envolve, além de periodontopatógenos, microrganismos oportunistas, dentre eles *Candida albicans*. O objetivo do presente estudo “*in vitro*” foi determinar o potencial antifúngico e antibiofilme do extrato do fruto de *P. guajava* para *Candida albicans*. Os extratos de *P.guajava* foram preparados, extraídos e diluídos. *C.albicans* foi preparada e inoculada a fim de se determinar a CIM, aplicação do biofilme e contagem de UFC. A análise estatística dos dados foram feitas utilizando ANOVA. A Concentração Fungicida Mínima (CFM) não conseguiu ser determinada devido à alta concentração e coloração do extrato. Com o biofilme de 24h, foi preparado para a inoculação com extrato, e assim poder determinar a CIM. Após, utilizou-se da CIM em sua concentração 10 vezes maior no extrato sobre o biofilme, para posterior análise. Em 5 minutos de exposição do extrato frente o biofilme, obteve-se 39% de redução das colônias de *C. albicans* e, em 24 horas de exposição, 23% de redução. Dessa forma, pode-se perceber a redução de UFC na presença do extrato em dois momentos diferentes. Portanto, foi possível concluir que o extrato de *P.guajava* possui melhor ação antimicrobiana e antibiofilme frente a *C.albicans* quando exposto por 5 minutos, sendo um potencial para futuras profilaxias orais, podendo estar em conjunto com outros medicamentos.

Palavras-chave: Psidium guajava. Candida albicans. Doença periodontal. Biofilme dentário.

Goldenstein HGMF. Antifungal effect of psidium guajava extract on candida albicans by vegetative forms and biofilm [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2018

ABSTRACT

Periodontal disease is an infectious-inflammatory disease and involves, besides periodontopathogens, opportunistic microorganisms, among them Candida albicans. The objective of the present in vitro study was to determine the antifungal and antibiofilm potential of P. guajava fruit extract for Candida albicans. Extracts of P.guajava were prepared, extracted and diluted. C. albicans was prepared and inoculated in order to determine MIC, biofilm application and CFU count. Statistical analysis of the data was done using ANOVA. Minimal Fungicide Concentration (CFM) could not be determined due to the high concentration and color of the extract. With the 24 hour biofilm, it was prepared for inoculation with extract, and thus to be able to determine MIC. Afterwards, the MIC was used in its concentration 10 times higher in the extract on the biofilm, for later analysis. In 5 minutes of exposure of the extract to the biofilm, a 39% reduction of the C. albicans colonies was obtained and, in 24 hours of exposure, a reduction of 23%. In this way, we can see the reduction of CFU in the presence of the extract in two different moments. Therefore, it was possible to conclude that the extract of P.guajava has a better antimicrobial action and antibiofilm compared to C. albicans when exposed for 5 minutes, being a potential for future oral prophylaxis and may be in conjunction with other medicinal products.

Keywords: Psidium guajava. Candida albicans. Periodontal disease. Dental biofilm.

1 INTRODUÇÃO

As periodontites são doenças infecto-inflamatórias de progressão lenta. A doença periodontal desencadeia alterações nos tecidos do periodonto, resultando na formação de bolsas periodontais, e a sua progressão pode causar a perda do elemento dentário (Lindhe et al., 2009; Socransky et al., 1984). As doenças periodontais são caracterizadas pela perda da inserção gengival, aparecimento de bolsas periodontais, inflamação gengival, hiperplasia ou recessão gengival, exposição da furca e a esfoliação dental. (Lindhe et al., 2013).

Habitam no biofilme subgengival uma grande diversidade de microrganismos os quais, em sua maioria, são compostos por espécies de microrganismos anaeróbios, como por exemplo: *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Tannerella forsythia* (Lindhe et al., 2013; Paster et al., 2001). Socransky et al. 1984, descreveram que a grande variação microbiológica presente no biofilme subgengival é decorrente da resposta do hospedeiro em relação ao supercrescimento de espécies oportunistas frente aos reais patógenos (Socransky et al., 1984). Essas espécies oportunistas que não são comumente encontradas em bolsas periodontais podem ser possíveis contribuintes da progressão da doença periodontal (Santos et al. 2002; Socransky, Haffajee 1992). Dentre estes microrganismos oportunistas que habitam os sítios afetados pela doença periodontal, destacam-se as espécies fúngicas, como por exemplo *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *Candida albicans* (Canabarro et al., 2009; Santos et al., 2002; Zomorodian et al., 2011).

Candida albicans é um fungo diplóide, oportunista que causa principalmente infecções vaginais e orais (Haynes, 2001; Munusamy et al., 2018). Esse fungo desenvolve um papel importante no desencadeamento de infecções bucais, tais como a candidose bucal, a gengivite e a periodontite; é frequentemente encontrada em idosos (principalmente os portadores de próteses), diabéticos, e imunossuprimidos (Järvensivu et al., 2004). O uso de antifúngicos sintéticos apresenta efeitos adversos nos pacientes acometidos por candidose, como o aumento da resistência de *C. albicans*, e o aparecimento de outros microrganismos

oportunistas não orais, como por exemplo *Pseudomonas aeruginosa* (Abílio et al., 2014; Marini et al., 2012; Silva, Lima, 2017).

Estudos demonstram que aproximadamente 17% dos pacientes com periodontite possuem colonização por *Candida albicans* em suas bolsas periodontais (Dahlén, Wikström, 1995; Kamma et al., 2004; Papapanou, 2002).

A espécie *Candida albicans* possui capacidade de formação de biofilme, o que confere proteção contra o meio externo e aumenta sua resistência, como no caso das bolsas periodontais (Gabriel, Rychłowski, 2017).

O biofilme dental é definido como um aglomerado de microrganismos, em uma matriz orgânica, onde sua formação se dá por substâncias salivares, polímeros bacterianos e também pela dieta do hospedeiro (Pereira et al., 2005). É caracterizada pela adesão de microrganismos a suportes sólidos, com consequente produção de substâncias poliméricas extracelulares, as quais imobilizam e protegem as células. O desenvolvimento do biofilme pode propiciar a sobrevivência de microrganismos em ambientes desfavoráveis (Costerton et al., 1999; Vieira et al., 2015).

O biofilme dental é um dos principais fatores etiológicos para início e progressão da doença periodontal, é removido através de métodos mecânicos e químicos. Apesar de o debridamento mecânico realizado através de raspagem e alisamento radicular (RAR) ser considerado o padrão-ouro para o tratamento e controle da doença periodontal, esta técnica não é eficiente para modificar o perfil microbiano patogênico presente nas bolsas periodontais (Darby, 2009). Sendo assim, há tratamentos que incluem uso de substâncias químicas coadjuvantes para controlar o crescimento microbiano, sendo os antibióticos, o principal deles. Dentre os antibióticos empregados no tratamento das doenças periodontais destacam-se o metronidazol e a tetraciclina (Brigantini et al., 2018; Yagiela, 1999).

O uso indiscriminado de antibióticos, no entanto, tende a aumentar a resistência de espécies bacterianas (Fio et al., 2000). De acordo com Ngowke em 2011, a resistência bacteriana varia de acordo com a região, o clima, e a condição física dos pacientes acometidos por microrganismos multirresistentes (Ngwoke et al., 2011). Como alternativa aos antibióticos, há terapias que incluem o uso de substâncias fitoterápicas (Yunes et al., 2001). Os fitoterápicos são medicamentos obtidos total ou parcialmente de matéria prima vegetal (Ferreira, Pinto, 2010).

Dentre os fitoterápicos mais estudados, encontra-se a *P. guajava*. A árvore de *P. guajava* é encontrada em diversas regiões tropicais e subtropicais do mundo, tendo como fruto a goiaba. Na composição da fruta, é possível descrever a presença de ferro, cálcio, açúcares, vitaminas e fósforo; todos com concentrações superiores à maioria das frutas (Gutiérrez et al., 2008). Por ser muito rico em fibras e carotenoides, possui papel importante na prevenção de alguns tipos de cânceres (como o de pele e o bucal), além de ter outras atividades farmacológicas, tais como: antioxidante, antialérgica, antimicrobiana, citotóxica, antiespasmódica e antiinflamatória. (Lemes, 2015; Padula, Rodriguez-Amaya, 1986; Pereira et al., 2009).

A atividade antioxidante presente no extrato do fruto de *P. guajava* foi estudada e comprovada. O seu uso permite a prevenção de diversas patologias relacionadas à pele e também permite vários usos potenciais no combate a doenças crônicas bucais (Chiari et al., 2012; Liu, Adom, 2007).

Estudos demonstram que o extrato de *P. guajava* possui atividade antimicrobiana, principalmente na versão aquosa do extrato frente a *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* e *Pseudomonas aeruginosa* (Abdelrahim et al., 2002; Bona et al., 2014; Santos et al., 2002). Há também relatos à respeito da atividade antifúngica do mesmo, através do macerado hidroalcoólico das folhas de *P. guajava*, contra *C. albicans* (Alves et al., 2006; Fonseca, Botelho, 2010).

A literatura ainda não demonstrou estudos utilizando o fitoterápico *P. guajava* contra *C. albicans* envolvida na doença periodontal, e sua correlação também com o biofilme. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi determinar o efeito antifúngico e antibiofilme do extrato de *P. guajava* frente a *C. albicans*.

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi determinar o potencial antifúngico e antibiofilme do extrato de goiaba (*Psidium guajava*) contra *Candida albicans*.

2.1 Objetivos específicos

- a) Determinar a CIM do extrato de *Psidium guajava* para *Candida albicans* SC5314 (*Candida Strains*) por meio da técnica de subcultivo;
- b) Determinar a Concentração Fungicida Mínima (CFM) do extrato de *Psidium guajava* para *Candida albicans* SC5314 por meio da técnica de subcultivo.
- c) Determinar ação antibiofilme da cepa de *Candida albicans* SC5314, após exposição ao extrato de *P. guajava* por 5 min e 24 horas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Preparação dos extratos

As goiabas foram colocadas com hipoclorito de sódio a 0,2% por 2 horas para desinfecção. Após esse período, os frutos foram enxaguados com água destilada e secos. Após 24 horas, os frutos foram cortados e submetidos à temperatura de cerca de 60°C até obterem peso constante. O material seco, foi triturado em um moinho de faca. O material foi acondicionado em embalagens de vidro, vedadas com plástico e estocadas a $-5\pm 2^{\circ}\text{C}$.

A extração foi efetuada através do método de percolação (Simões et al., 2007).

Para a extração a partir de 50 gramas de fruta seca e pulverizada foram utilizados 1500mL de etanol à 70% aquoso, em fluxo contínuo sob a amostra durante 96 horas. O procedimento foi realizado à temperatura ambiente ($24\pm 2^{\circ}\text{C}$) e ao abrigo da luz

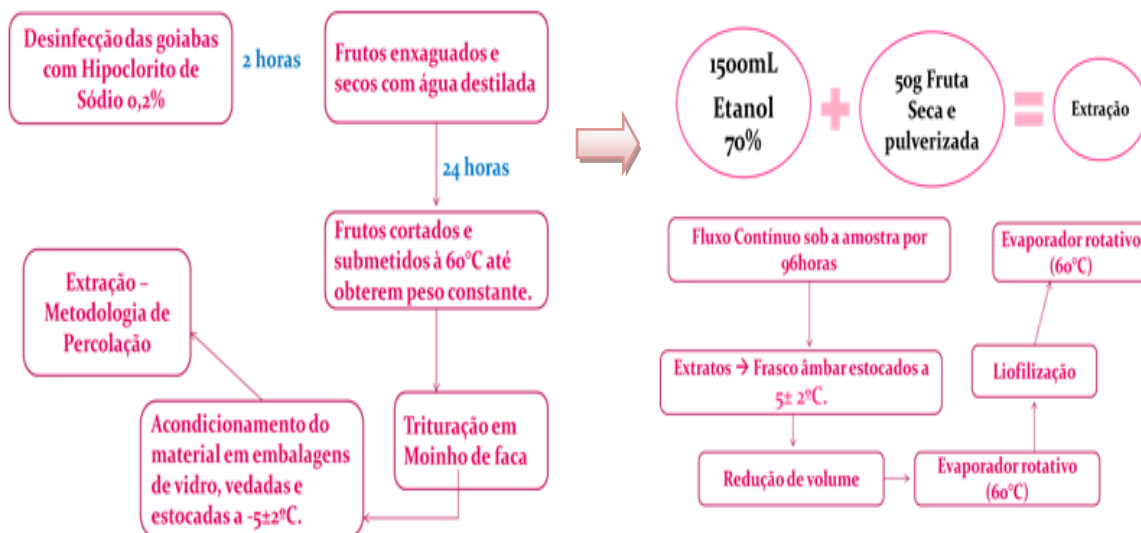
Os extratos obtidos foram acondicionados em frascos âmbar e estocados a $5\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Para a redução do volume, os extratos foram submetidos a evaporador rotativo (MA-120, Marconi), à temperatura máxima de 60° C e, em seguida, foram liofilizados (Modulyo D Freeze Dryer, Thermo Scientific).

Após liofilização, foram mantidos em frascos de vidro âmbar a $5 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (Chiari et al., 2012).

Todo esse processo pode ser melhor observado na figura 1:

Figura 1 - Fluxograma de preparação de *P.guajava*.



Preparação de *P.guajava*, de acordo com a bibliografia citada.

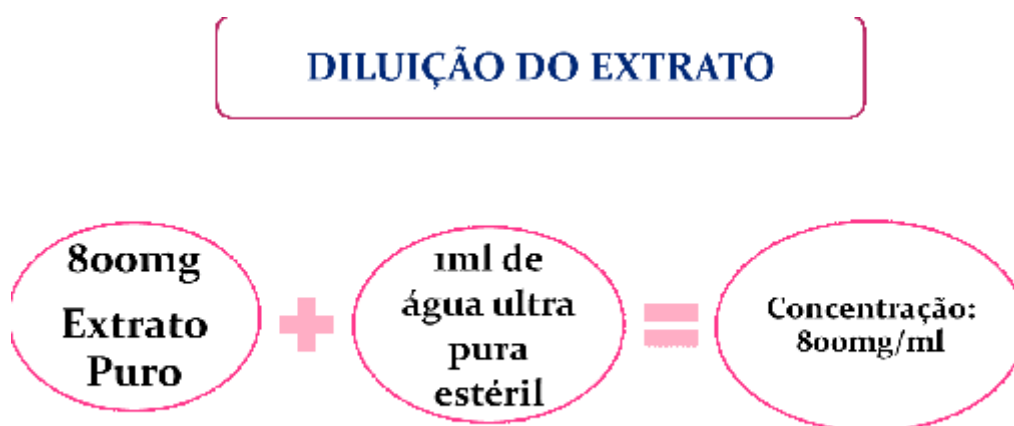
Fonte: Elaborado pelo autor.

3.2 Diluição do extrato

Para preparar o extrato na concentração de 800 mg/ml para a realização da CIM, pesou-se 800 mg (Figura 1A) de extrato puro em um tubo Falcon e a este foi adicionado 1 ml de água ultra pura estéril, para homogeneização da suspensão, agitou-se o tubo por 1 min em vórtex.

Após obtido o valor da CIM, preparou-se da mesma maneira uma nova suspensão com 10 vezes a concentração obtida na CIM, resultando em uma concentração de 4g/mL (Figura 1B) para utilização no biofilme.

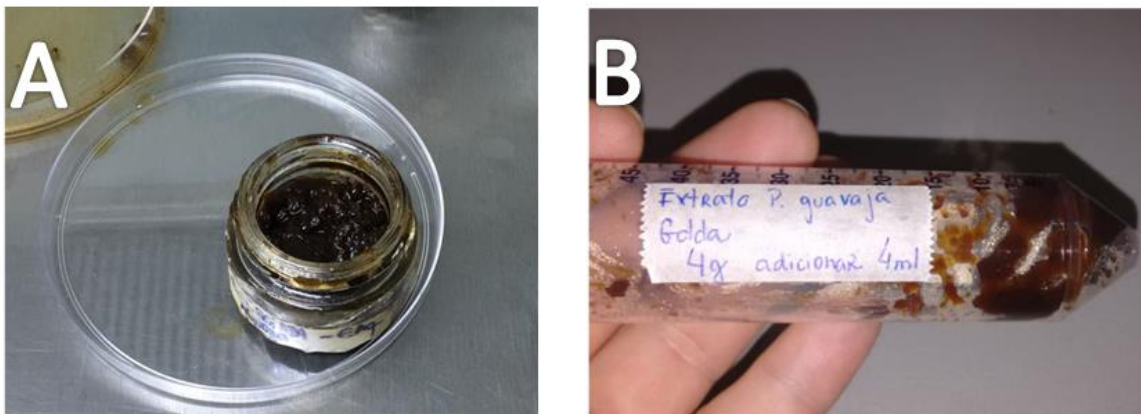
Figura 2 - Diluição do extrato de *P.guajava*



Diluição de *P.guajava*.

Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 3 - Extratos de *Psidium guajava*



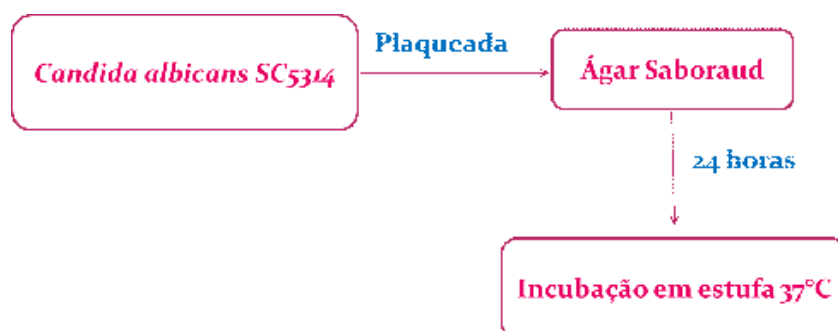
(a) Extrato aquoso de *P. guajava*; (b) Tubo Flacon com extrato pesado para preparação de suspensão para aplicação no biofilme.

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3 Cultivo dos microrganismos

Foi utilizada a cepa de *Candida albicans* SC5314. A cepa de *Candida albicans* foi plaqueada em ágar Saboraud, e encubada em estufa por 24 horas, à temperatura 37°C.

Figura 4 - Inoculação de *C.albicans*



Esquema de inoculação de *C.albicans*.

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.4 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A determinação da Concentração Inibitória Mínima do extrato foi realizada utilizando adaptações do método de microdiluição em meio líquido, segundo o padrão da norma M27-A2(Figueira, 2017; NCCLS, 2002) para leveduras, preconizada pelo Clinical and Laboratory Standards Institute(CLSI),

O método é adaptado pois a CLSI é uma normativa utilizada para ensaios utilizando antifúngicos convencionais.

3.4.1 Preparação da microdiluição em caldo

Após o cultivo de 24 horas do microrganismo, foram realizadas suspensões microbianas em solução salina estéril (NaCl 0,9%), com concentrações 10^6 UFC/mL padronizadas em espectrofotômetro (Micronal, SãoPaulo, Brasil), e comprimento de onda de $\lambda = 530\text{nm}$ para *Candida albicans*.

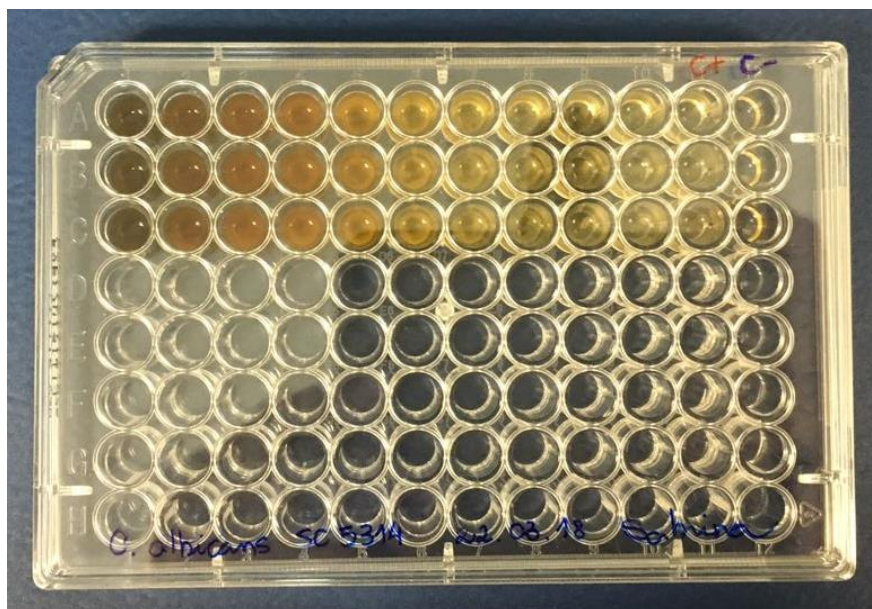
Utilizou-se a microplaca de 96 poços para realização da microdiluição em triplicata. Inicialmente, pipetou-se 100 μL de caldo RPMI em todos os 12 poços da microplaca. Em seguida, pipetou-se 100 μL do extrato aquoso na concentração de 800 mg/mL e o transferiu, apenas no primeiro poço, de onde foi iniciada a diluição seriada (1:2). Portanto, a concentração inicial do primeiro poço foi 400 mg/mL. Foram obtidas dez diluições do extrato, com concentrações diferentes. Acrescentou-se 100 μL do inóculo padronizado em todos os poços. A concentração final do inóculo fúngico foi de 10^3 UFC/mL em cada poço. Ao poço número 11 também foi adicionado o inóculo, e este foi o controle positivo. O poço de número 12 foi o controle negativo, contendo apenas o caldo RPMI. As microplacas foram incubadas por 24 horas em estufa à temperatura de 37°C.

Figura 5 - Diluição do extrato



Fonte: Elaborado pelo autor.

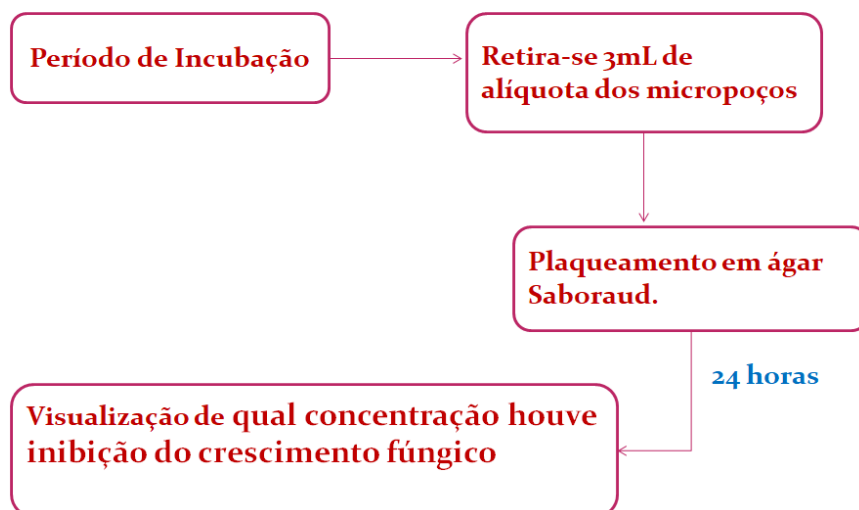
Figura 6 - Microplaca de 96 poços pronta para a realização da CIM de *C.albicans*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

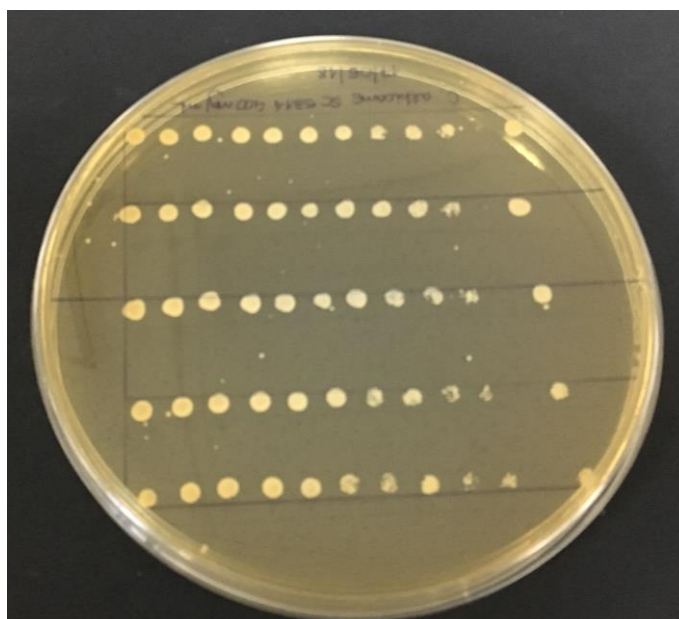
O extrato por ser colorido dificulta a visualização do crescimento microbiano, e portanto a determinação da CIM, neste casos, é realizada a técnica de subcultivo, após o período de incubação, utiliza-se pipeta multicanal, e retira-se 3 μ L de alíquota dos poços da microplaca, e realiza-se o plaqueamento em ágar Saboraud, para visualizar em qual concentração houve inibição do crescimento fúngico (Figura 3). Essa técnica é utilizada para determinação da CIM e da CFM. Esse processo foi realizado em triplicata, e também em dias diferentes, para melhor entendimento dos resultados.

Figura 7 - Técnica de subcultivo



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 8 - Realização da técnica de subcultivo para determinação da CIM e CFM



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.5 Formação do biofilme

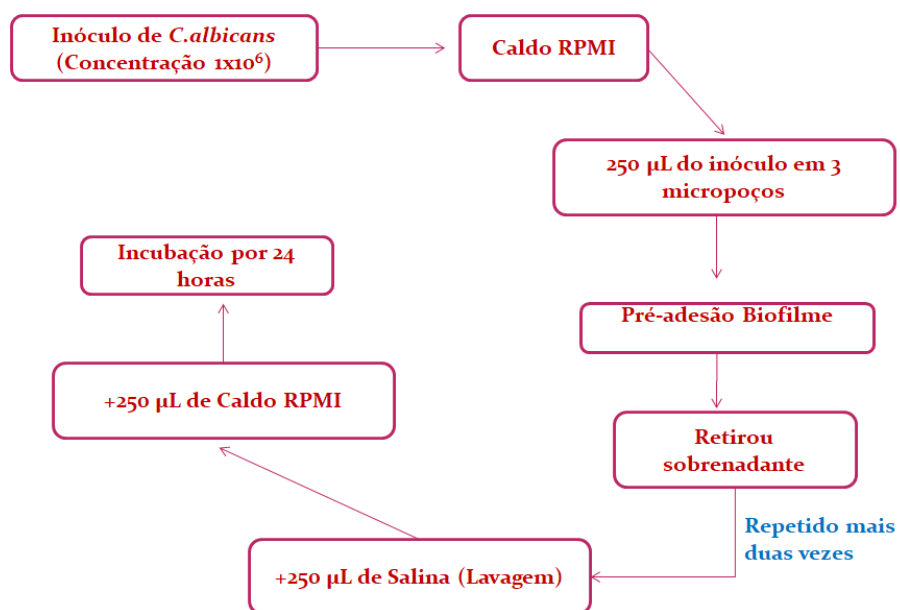
Para a formação do biofilme foi preparado um inóculo de *C.albicans* com uma concentração final de 1×10^6 em caldo RPMI de (Ramage et al., 2001).

Foram adicionados 250 μ L do inóculo em cada um dos 3 poços da microplaca, em seguida, a microplaca foi incubada no homogeneizador (C24 incubator shaker – New Brunswick Scientific) por 90 minutos (75 rpm; 37°C), para pré-adesão do biofilme.

Transcorrido o tempo, retirou-se com cuidado o sobrenadante, e adicionou-se 250 μ L de solução salina, para lavagem do biofilme, com intuito de remover células não aderidas. Esse processo de lavagem foi repedido duas vezes.

Em sequência, adicionou-se 250 μ L de caldo RPMI e incubou-se a microplaca por 24 horas no homogeneizador com rotação e temperatura controlados (75 rpm; 37°C).

Figura 9 - Formação do biofilme



Fonte: Elaborado pelo autor.

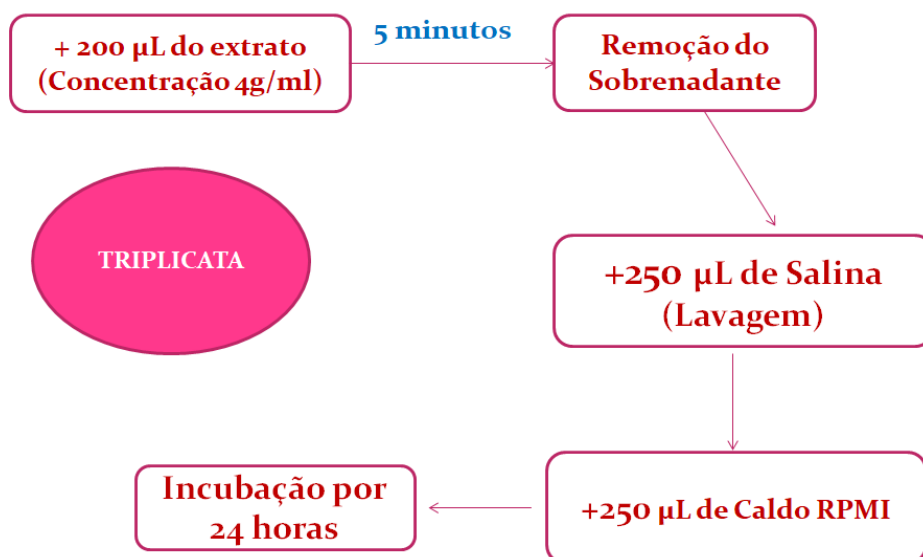
3.6 Aplicação do extrato de *P. guajava* no biofilme

Após 24 horas de crescimento do biofilme, adicionou-se ao biofilme pré-formado 200 μL do extrato de *P. guajava* na concentração de 4g/mL por 5 minutos. Após o tratamento, o sobrenadante do extrato foi removido, e o biofilme foi lavado duas vezes com solução salina.

O mesmo tratamento foi realizado sobre o biofilme, no entanto com exposição do extrato por 24 horas.

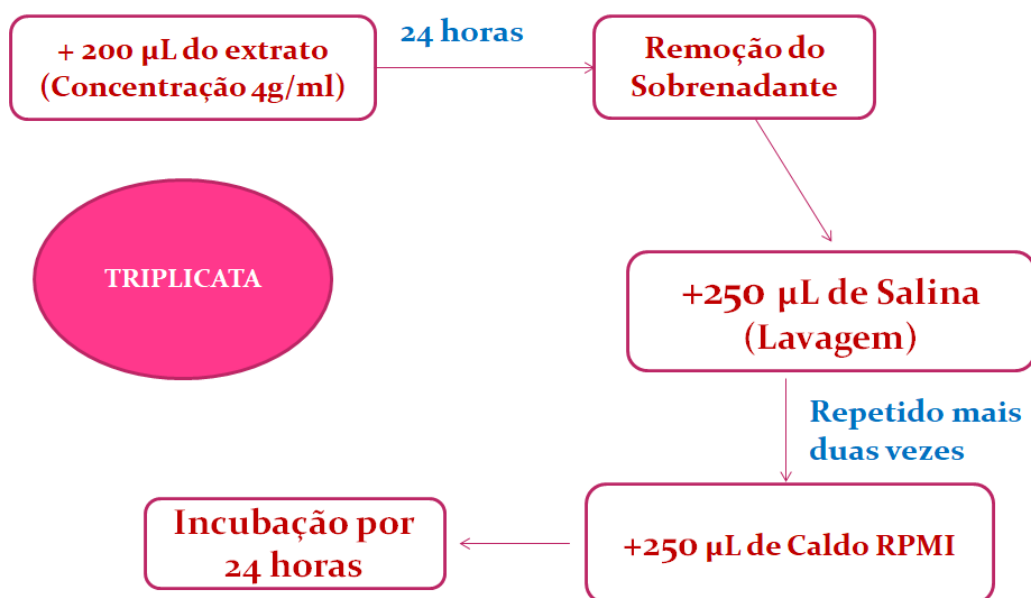
Esse procedimento foi realizado em triplicata para o grupo de tratamento em dois tempos diferentes: 5 minutos e 24 horas.

Figura 10 - Aplicação do extrato sob o biofilme de 5 minutos



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 11 - Aplicação do extrato sob o biofilme de 24 horas



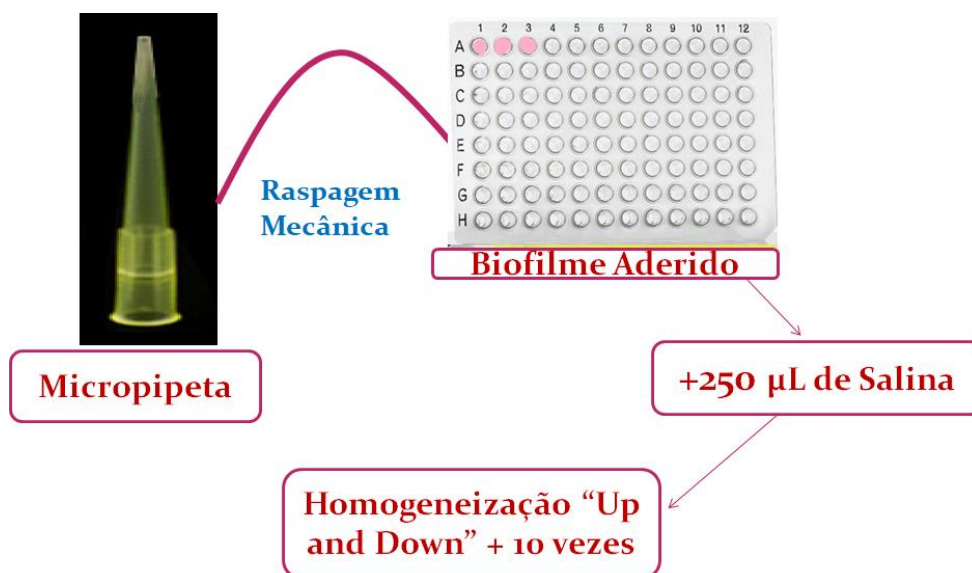
Fonte: Elaborado pelo autor.

3.7 Remoção do biofilme

Para a desprender o biofilme formado e tratado, utilizou-se uma ponteira descartável. Foi realizada a raspagem mecânica do biofilme aderido ao fundo da placa, e 250 μ L de solução salina foi acrescentada a cada um dos poços. Em seguida, a homogeneização foi feita com pipeta, através de movimentos de “*up and down*”, por 10 vezes.

Esse procedimento foi realizado para o grupo de tratamento, por 5 minutos e 24 horas.

Figura 12 - Remoção do Biofilme



Fonte: Elaborado pelo autor

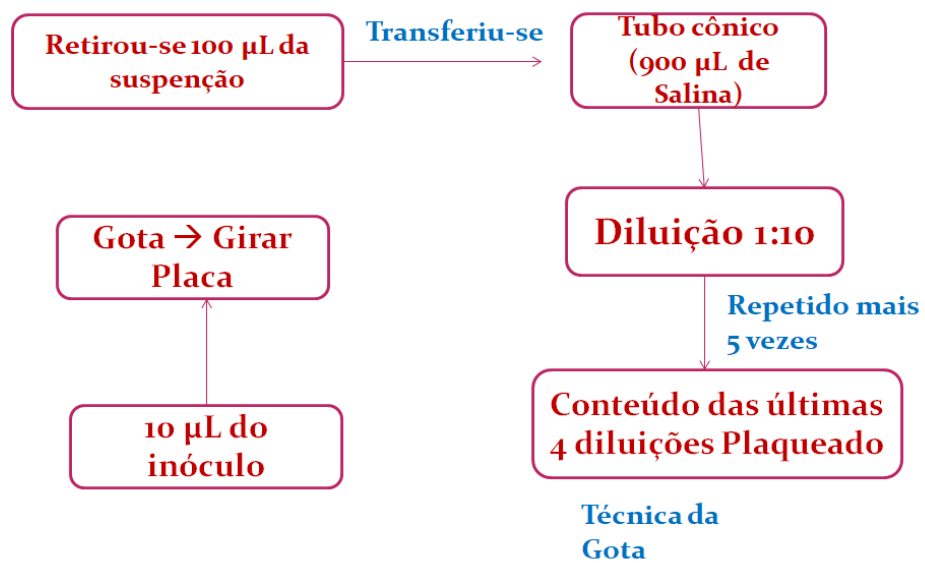
3.8 Contagem de unidades formadoras de colônias

Para realizar o plaqueamento e posterior contagem de colônias, retirou-se 100 μ l da suspensão pré-formada com solução salina e biofilme removido, os quais foram transferidos para um tubo cônico descartável de 2 ml contendo 900 μ l de solução salina. Após, foi realizada uma diluição de 1:10, e este processo foi repetido por 5 vezes.

O conteúdo das 4 últimas diluições, nas concentrações de 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} foram plaqueados em ágar Saboraud utilizando a técnica da gota (Herigstad et al., 2001) (Figura 4), que consiste em plaquear uma gota contendo 10 μ l do inóculo. Após transferência da gota para a placa realiza-se um movimento de girar a placa, para que a gota se deslize pelo ágar.

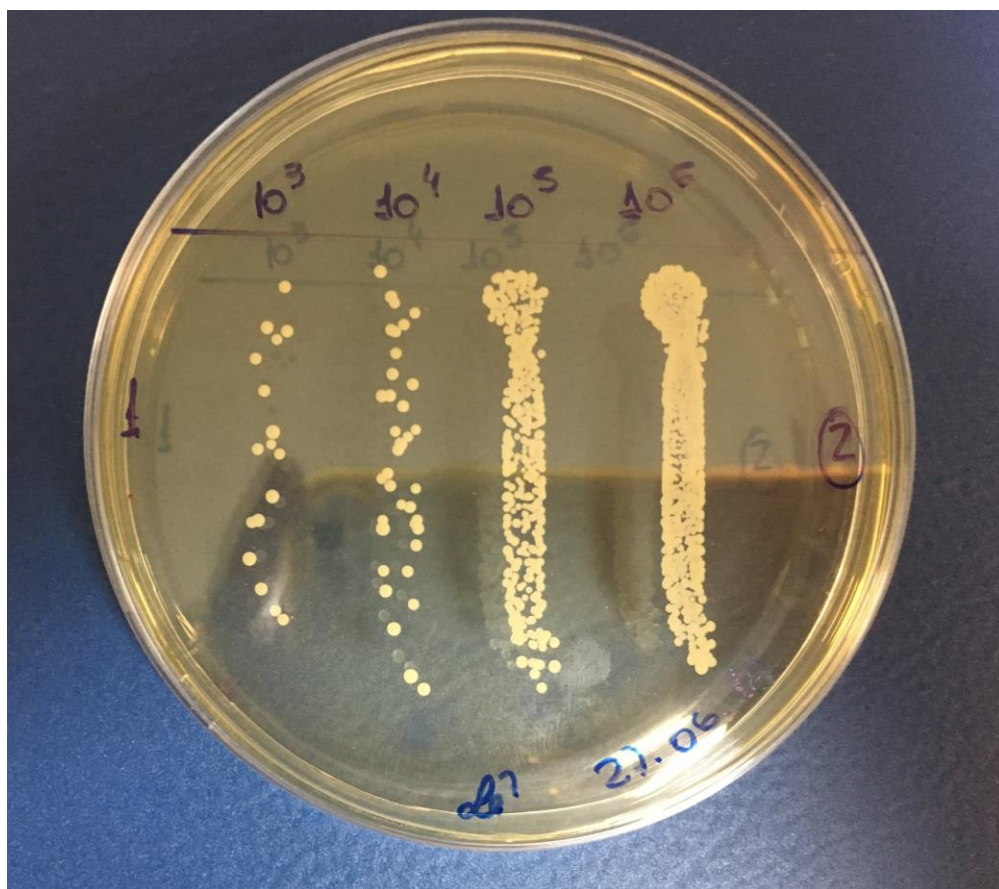
Para determinar o número de UFC, realiza-se a multiplicação da quantidade plaqueada pelo fator de diluição em função do número de colônias contadas.

Figura 13 - Contagem de UFC



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 14 - Realização da técnica da gota.



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.9 Análise estatística

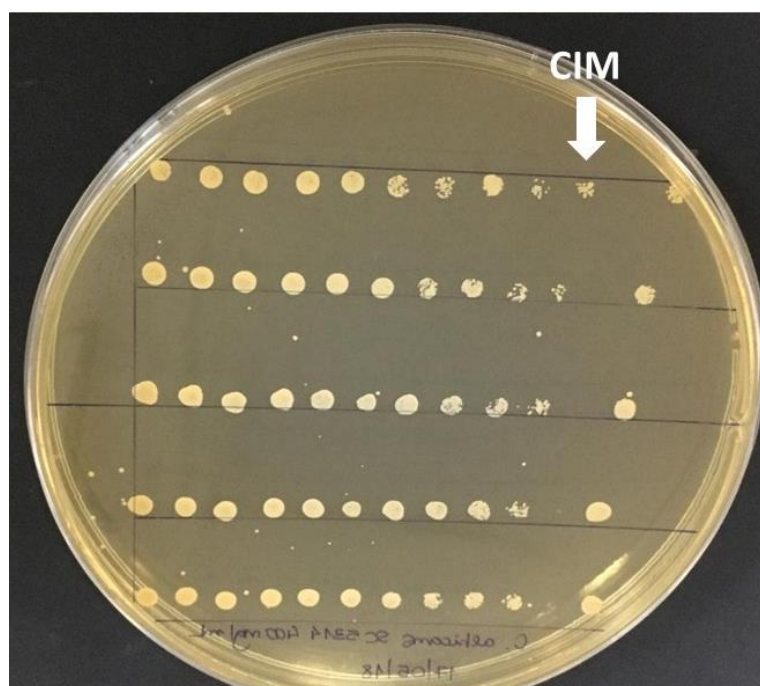
Para comparar os efeitos antibiofilme após tratamento com o extrato, realizou-se as análises estatísticas no software Origin 8.0. Performou-se o teste de normalidade de Shapiro-Wilk com nível de significância ($p=0,05$), e o teste de análise de variância one way (ANOVA), com nível de significância ($p=0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 Determinação da concentração inibitória mínima

A determinação da CIM foi realizada conforme o protocolo destacado no item 3.4.1 em Materiais e Métodos. Para facilitar a identificação da CIM, uma vez que, o extrato era escuro e turvo, fez-se necessário utilizar a técnica de subcultivo. Dessa forma, pode-se observar através do crescimento fúngico a CIM, como mostra a seta branca da Figura 5.

Figura 15 - Técnica de subcultivo revelando a CIM para *C.albicans* indicada pela seta branca.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Observou-se que primeira fileira referente aos poços de número 1 da placa eram responsáveis pela CIM. Portanto inferiu-se a eles a CIM – Concentração Inibitória Mínima de 400 mg/mL do extrato de *P. guajava*, como pode-se observar na Figura 5. Todos os demais poços tiveram crescimento na placa acima de 50%.

Os valores das concentrações em todos os poços, assim como a concentração responsável pela CIM em ambos os microrganismos, estão representados na Tabela 1.

Tabela 1 - Representação da microdiluição em placa com os valores das diferentes concentrações do extrato de *P. guajava* em mg/mL e concentração da CIM representada nas colunas em amarelo para *C. albicans*.

Cepa	Linhas	Colunas											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>C.albicans</i>	B	400	200	100	50	25	12,5	6,25	3,125	1,5625	0,78125	400	200
	C	400	200	100	50	25	12,5	6,25	3,125	1,5625	0,78125	400	200
	D	400	200	100	50	25	12,5	6,25	3,125	1,5625	0,78125	400	200

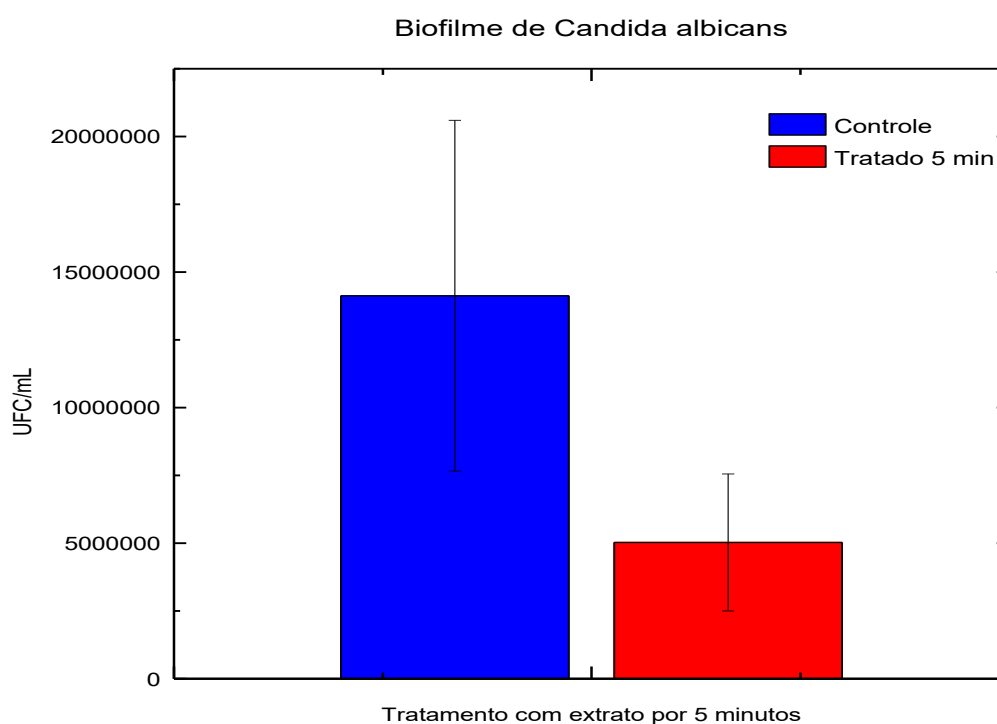
Legenda: Os valores das diferentes concentrações do extrato de *P. guajava* estão representados em mg/mL e a concentração da CIM para *C.albicans* está representada nas colunas 1 e 3.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.1.2 Ação do extrato sob o biofilme

Os resultados mostram a atividade antibiofilme do extrato de *P.guajava* após 5 minutos de tratamento. É possível observar no gráfico (Figura 6) que houve uma redução significativa de 36% do biofilme após a contagem de unidades formadoras de colônias.

Figura 16 - Gráfico de crescimento de UFC/ml do biofilme 24 horas após tratamento com extrato por 5 minutos.



Legenda: Gráfico de barras elucidando o controle (em azul) e o material tratado em 5 minutos de exposição. Pode-se observar que o material tratado, atinge quase metade do grupo controle.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Após análise estatística de normalidade, observou-se que os dados dos

biofilmes controles e dos biofilmes tratados eram normais (Tabela 2 e 3) e então foram analisados através da análise de variância (ANOVA), e houve diferença significativa estatística entre o grupo tratado por 5 minutos e o grupo controle, o que confirma a redução do biofilme.

Tabela 2 - Ação do extrato de *P.guajava* por 5 minutos sobre o biofilme de *C.albicans*.

5 Minutos			
	1 dia	2 dia	3 dia
Diluição	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶
Controle 1	11	14	5
Controle 2	19	20	19
Controle 3	5	5	20
Total	11,67	13	14,67
Extrato 4	4	3	8
Extrato 5	4	10	2
Extrato 6	5	4	5
Total	4,33	5,67	5,00

Legenda: Efeito do extrato de *Psidium guajava* quando exposto durante 5 minutos sobre o biofilme de *C.albicans*. Pode-se observar o efeito do extrato quando comparado ao grupo controle.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 3 - Efeito do Extrato sob o biofilme após plaqueamento da amostra, e exposição por 5 minutos do extrato sobre o biofilme.

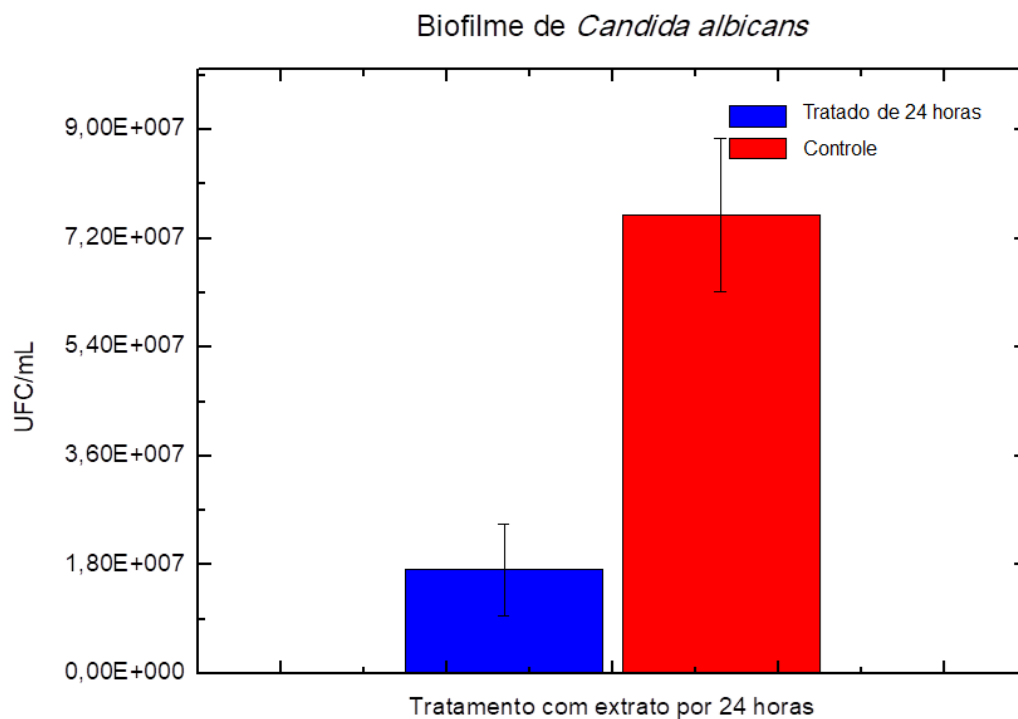
Extrato 5 minutos			
Experimento/ Amostra	Controle (UFC)	Experimento/ Amostra	Tratado (UFC)
1/1	11.000.000	4/1	4.000.000
1/2	19.000.000	4/2	4.500.000
1/3	5.000.000	4/3	5.000.000
2/1	14.000.000	5/1	3.000.000
2/2	20.000.000	5/2	10.000.000
2/3	3.000.000	5/3	4.000.000
3/1	5.000.000	6/1	8.000.000
3/2	19.000.000	6/2	1.700.000
3/3	20.000.000	6/3	5.000.000
Media	12.888.889	Media	5.022.222

Legenda: Contagem de colônias em UFC demonstra que em 05 minutos de exibição o extrato reduziu 39% do biofilme.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os resultados dos biofilmes tratados com extrato por 24 horas, mostraram um comportamento diferente, quando comparados ao tratamento por 5 minutos. Houve um aumento de 23% do biofilme de *C. albicans* após o tratamento, como pode ser observado na Figura 7.

Figura 17 - Gráfico de crescimento de UFC/ml do biofilme 24 horas após tratamento com extrato por 24 horas.



Legenda: Gráfico de barras elucidando o controle (em azul) e o material tratado em 24 horas de exposição. Pode-se observar que o material tratado, possui resultados positivos, quando comparado com o grupo controle.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Após análise estatística de normalidade, observou-se que os dados dos biofilmes controles e dos biofilmes tratados eram normais (tabelas 4 e 5) e então foram analisados através da análise de variância (ANOVA), e houve diferença significativa estatística entre o grupo tratado por 24 minutos e o grupo controle, o que confirma o aumento do biofilme.

Tabela 4 - Ação do extrato de *P.guajava* por 24 horas sobre o biofilme de *C.albicans*.

Eventos Indep.	24 Horas		
	1 dia	2 dia	3 dia
Diluição	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶
Controle 1	15	6	18
Controle 2	9	15	15
Controle 3	21	26	30
Total	15,00	15,67	21,00
Extrato 4	58	70	67
Extrato 5	75	79	75
Extrato 6	95	68	96
Total	76,00	72,33	79,33

Legenda: Efeito do extrato de *Psidium guajava* quando exposto durante 24 horas sobre o biofilme de *C.albicans*. Pode-se observar o efeito do extrato quando comparado ao grupo controle.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 5 - Efeito do Extrato sob o biofilme após plaqueamento da amostra, e exposição por 24 horas do extrato sobre o biofilme.

Extrato 24 horas			
Experimento/ Amostra	Controle (UFC)	Experimento/ Amostra	Tratado (UFC)
1/1	15.000.000	4/1	58.000.000
1/2	9.000.000	4/2	75.000.000
1/3	21.000.000	4/3	95.000.000
2/2	6.000.000	5/1	70.000.000
2/2	15.000.000	5/2	79.000.000
2/3	26.000.000	5/3	68.000.000
3/1	18.000.000	6/1	67.000.000
3/2	15.000.000	6/2	75.000.000
3/3	30.000.000	6/3	96.000.000
Media	17.222.222	Media	75.888.889

Legenda: Contagem de colônias em UFC demonstra que em 24 horas de exibição o extrato reduziu 23% do biofilme.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5 DISCUSSÃO

O uso de extratos fitoterápicos com ação antimicrobiana, anestésica e anti-inflamatória, têm sido estudado na área odontológica, como métodos alternativos para tratamento e prevenção de doenças bucais (Agra et al., 2007; Silva et al., 2006).

A Clorexidina é um dos colutórios mais utilizados na terapia da doença periodontal (Cordeiro et al., 2006). No entanto, no ano de 2004, Loureiro e seus colaboradores afirmaram que a Clorexidina, possuía um gosto amargo, que interferia no paladar do paciente, principalmente naqueles que eram acometidos por periodontite, o que inviabilizaria portanto, o uso da mesma no tratamento da doença periodontal (Loureiro et al., 2004).

P.guajava tem sido estudada na odontologia, devido aos seus efeitos antimicrobianos positivos em periodontite (Kornman, 2008; Kumar et al., 2009; Somu et al., 2012).

Em 2015, Braga e seus colaboradores observaram que o uso “popular” de *P.guajava* em diversas formas, como emplastros, chás e bochechos eram cientificamente eficazes, já que os seus estudos demonstraram o efeito antimicrobiano do extrato, diminuindo uma população de *C. albicans* (Morais-Braga et al., 2017). Esse mesmo estudo, demonstrou que o contato direto da mucosa infectada em uma infusão de chá ou gargarejo contendo *P.guajava* diminuía a concentração do microrganismo no paciente infectado. Ou seja, o uso de *P.guajava* como um possível colutório bucal não só pode reduzir a quantidade de microrganismos viáveis na mucosa oral, mas também pode perturbar o processo de transição morfológica da levedura de *C.albicans*, o que conseqüentemente diminui o seu fator de virulência.

Recentemente, um estudo feito no Paquistão, demonstrou que o extrato de *P. guajava* mantinha a melhor eficácia sobre colônias de *C.albicans*, demonstrando inclusive o seu sucesso perante o uso de outro extrato, sendo a sua eficácia cerca de 40% maior em relação à outros extratos (Ansari, 2018), o que corrobora a

eficácia do tratamento no biofilme de *C.albicans* realizado no presente estudo.

Não obstante, Alves e seus colaboradores relataram um estudo de 1991, onde a goiabeira possuía atividade antifúngica, observando que, o macerado hidroalcoólico de suas folhas em *C.albicans* apresentou efeito positivo; o que também é demonstrado no presente estudo; onde tem-se a atividade em 5 minutos do uso do extrato sob o biofilme de *C.albicans* com melhor efeito do que com o uso em 24 horas, tendo 39% de ação sob o biofilme. O que pode ser explicado pelo extrato ser hidroalcoólico, e possuir açúcares, que podem ser consumidos pelo microrganismo como fonte de alimento, explicando assim, o efeito de apenas 23% de redução de biofilme. Sendo esses resultados extremamente importantes para o estudo, haja vista que espécies de *Candida* (incluindo a espécie *C.albicans*), estão presentes em 70% dos isolamentos da região oral. (Alves et al., 2006).

Em 2010 Fonseca e Botelho conseguiram observar a inibição do crescimento de três espécies de *Candida*, incluindo *C.albicans*, onde a mesma apresentava a maior zona de inibição com 14mm, frente o uso do extrato de *P.guajava* (Fonseca, Botelho, 2010). Outro estudo, também demonstrava o efeito de *P.guajava* em diferentes tipos de extratos (acetônico, etanólico, aquoso), estudando diferentes espécies do gênero *Candida*, incluindo *Candida albicans*, com CIM de 15 a 250 µg / mL.

Em 2009, um estudo feito por Menezes e seus colaboradores demonstrou que a CIM de *Candida albicans* para o extrato de *P.guajava* era mediana. De acordo com os critérios de avaliação desse estudo, quando a CIM está entre 101 e 500mg/ml, a mesma é considerada como moderada atividade antifúngica. O que pode-se observar no presente estudo, onde, obteve-se uma CIM de 400 mg/ml do extrato frente a cepa de *C.albicans*.(Menezes et al., 2009).

A CIM do presente trabalho, também apresentou melhores resultados do que o trabalho anteriormente citado, onde a CIM era de 125mg/ml, e neste obteve-se 400 mg/ml, demonstrando que além de eficiente, o extrato de *P.guajava* está de acordo com outras literaturas, que demonstram a eficácia do extrato frente a *C.albicans*.(Alves et al., 2006; Ghosh et al., 2008)

Um estudo realizado por Piva e seus colaboradores em 2011, demonstrava a virulência do biofilme de *C. albicans* isoladamente e também multi-espécie conjuntamente com *E.coli*. Foi observado, que quando isolado, o biofilme da espécie

fúngica possui maiores fatores de virulência, sendo assim, o tratamento do mesmo com extrato de *P.guajava*, é uma maneira eficaz de se combater o mesmo (Piva et al., 2011).

O potencial antimicrobiano de *P.guajava* pode ser observado em um estudo realizado em 2014, onde foi possível observar o potencial antimicrobiano desse extrato frente a bactérias como *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, obtendo-se CIM de 100µg/ml, 250 µg/ml e 500 µg/ml. Por essa razão, pode-se observar que o potencial antimicrobiano do presente estudo também foi satisfatório, quando comparado ao potencial do extrato em outros tipos de microrganismos (Fernandes et al., 2014).

Um estudo comparativo recente, demonstrava que, *P.guajava* possui efeitos antimicrobianos satisfatórios frente *C.albicans* do que outras, tais como *Cymbopogon Citratus* (Capim limão), já que, nesse estudo, *Cymbopogon Citratus* não apresentou nenhum efeito frente à espécie fúngica, sendo assim, possível o uso de *P.guajava* como uma boa alternativa para o tratamento antifúngico (Ansari, 2018).

Em outro estudo, onde foi analisado o potencial de *P. guajava* em conjunto com *P. brownianum* juntamente com fluconazol, pode-se observar que houve potencialização do efeito do medicamento frente a *C.albicans*, sendo que, esses resultados positivos podem estar associados à presença de flavonoides e dos compostos fenólicos dos extratos, sendo necessário analisar mais à fundo cada extrato separadamente (Morais-Braga et al., 2016).

Análises realizadas em 2014, demonstraram que o extrato de *P.guajava* possuía capacidade de romper o biofilme bacteriano, mas esse análise não obteve sucesso quando o extrato foi exposto à *C. albicans* (Mehta et al., 2014).

Os resultados antimicrobianos e antibiofilmes apresentados na presente pesquisa, demonstram que, diferentemente do que citado por Martínez e seus colaboradores em 1997, onde o extrato de *P.guajava* não possuía nenhuma atividade frente a *C.albicans*, na presente, demonstrou-se que, além de uma CIM de 400mg/ml, também se obteve 39% de redução do biofilme, quando exposto ao extrato por 5 minutos (Martínez et al., 1997).

Um Estudo recente, analisou a atividade antimicrobiana de *C. albicans* frente a outro tipo de extrato, o de *Psidium cattleianum* (Araçá-Rosa). Esse estudo demonstrou que, quando o extrato é exposto nas primeiras 24 horas ao

microrganismo, esse apresenta redução da sua quantidade de colônias. Fato, que corrobora o presente estudo, já que com a exibição de 5 minutos, obteve-se 39% de redução do biofilme de *C.albicans* (Sangalli et al., 2018).

Diante da presente podemos observar que, assim como em estudos anteriores, o extrato de *P.guajava* demonstra atividade antifúngica perante o biofilme de *C.albicans*, também no presente estudo (Alves et al., 2006; Ansari, 2018).

Após análise dos resultados observou-se que o extrato aquoso de *P. guajava* teve resultados que corroboram com a literatura demonstrando uma ação antifúngica deste extrato contra *Candida albicans*. Todavia no hospedeiro este fungo comensal encontra-se colonizado na forma de biofilmes, e até o presente momento não havia relatos na literatura da ação deste extrato sobre ação antibiofilme.

Após o tratamento com o extrato na concentração de 4g/mL observou-se uma redução significativa de 36% do biofilme já formado, após a contagem de unidades formadoras de colônia, o que mostra que o extrato consegue penetrar no biofilme e inativar as células fúngicas.

Um resultado diferente foi observado após o tratamento do biofilme por 24 horas de extrato, uma vez que houve um aumento expressivo do biofilme tratado. Todavia este resultado pode ser explicado de acordo com o caráter bioquímico do extrato. Por tratar-se de um extrato aquoso produzido a partir dos frutos da *Psidium guajava* (goiaba), os mesmo contém um alto teor de polissacarídeos em sua composição, que em uma aplicação de 24 horas funcionaram como substrato para o desenvolvimento do fungo, uma vez que fungos tem um metabolismo altamente dependente de açúcares.

Todavia, vislumbrando uma aplicação comercial, nenhum medicamento tópico na região oral teria uma fixação tão prolongada, pensando no desenvolvimento de uma pomada orabase, por exemplo.

Para uma formulação de pomada ou colutório, os 5 minutos de exposição apresentou eficácia satisfatória.

Todavia para complementar este trabalho, estudos futuros precisam ser desenvolvidos, adicionando este extrato a uma formulação comercial, e também realizando ensaios de citotoxicidade para avaliar se na concentração de 4 g/mL este não seria tóxico para as células do hospedeiro.

6 CONCLUSÃO

Diante das limitações deste estudo, pode-se concluir que o extrato de *P.guajava* apresenta efeito antimicrobiano e antibiofilme frente a *C.albicans*. No entanto, mais estudos devem ser realizados para o desenvolvimento de um colutório bucal ou pomada orabase à base de *P.guajava*, o que possivelmente trará eficácia para o tratamento de pacientes com doença periodontal ou com candidose bucal.

REFERÊNCIAS*

- Abdelrahim SI, Almagboul AZ, Omer ME, Elegami A. Microbiano activity of Psidium guajava L. *Fitoterapia*. 2007;17(1):114-40. PubMed PMID: 12490238.
- Abílio VMF, Mesquita BS, Silva ED, Carvalho FVQ, Macêdo LLA, Castro RD. Atividade antifúngica de produtos naturais indicados por raizeiros para tratamento de candidose oral. *Rev Cubana Estomatol*. 2014;51(3):259–69.
- Agra MF, Freitas PF, Barbosa-Filho JM. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Brazilian J Pharmacogn*. 2007;17(1):114-40. doi: 10.1590/S0102-695X2007000100021.
- Alves PM, Leite PHAS, Pereira JV, Pereira LF, Pereira MSV, Higino JS, et al. Atividade antifúngica do extrato de Psidium guajava Linn. (goiabeira) sobre leveduras do gênero *Candida* da cavidade oral: uma avaliação in vitro. *Rev Bras Farmacogn*. 2006;16(2):192-6. doi: 10.1590/S0102-695X2006000200010.
- Ansari MT, Bhatti MA, Tariq F. Evaluation of antibacterial and antifungal activities of cymbopogon citratus and psidium Guajava from Sialkot origin evaluation of antibacterial and antifungal activities. *Pharmacology online*. 2018; 1:155-163.
- Bona EAM De, Pinto FGDS, Fruet TK, Jorge TCM, Moura AC De. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. *Pharmacology*. 2014;81(3):218–25. doi: 10.1590/1808-1657001192012.
- Brigantini LC, Marques GJ, Gimenes M. Antibióticos em odontologia. *Revista uningá*. 2018;1(49):121-127.
- Canabarro A, Varzea D, Marques G, Coelho JC, Lazera M, Wanke B. Fungos na periodontite crônica: revisão da literatura. *Rev Clínica e Pesqui Em Odontol*. 2009;5(2):135–9.
- Chiari BG, Severi JA, De Pauli-Credendio PA, Sylos CM de, Vilegas W, Correa MA, et al. Assessment of the chemical profile, polyphenol content and antioxidant activity in extracts of Psidium Guajava L. fruits. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2012;4:331–6.
- Cordeiro CHG, Sacramento LVS do, Corrêa MA, Pizzolitto AC, Bauab TM. Análise farmacognóstica e atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados em formulação para a higiene bucal. *Rev Bras Ciências Farm*. 2006;42(3):395–404. doi: 10.1590/S1516-93322006000300008.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso em 25 jan 2017]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

persistent infections. *Science*. 1999;284(5418):1318–22. doi: 10.1126/science.284.5418.1318. PMID: 10334980.

Dahlén G, Wikström M. Occurrence of enteric rods, staphylococci and *Candida* in subgingival samples. *Oral Microbiol Immunol*. 1995;10(1):42–6. doi: 10.1111/j.1399-302X.1995.tb00116.x. PMID: 7644272.

Darby I. Non-surgical management of periodontal disease. *Aust Dent J*. 2009 Sep;54 Suppl 1:S86-95. doi: 10.1111/j.1834-7819.2009.01146.x. Review. PubMed PMID: 19737271.

Fernandes MRV, Dias ALT, Carvalho RR, Souza CRF, Oliveira WP. Antioxidant and antimicrobial activities of *Psidium guajava* L. spray dried extracts. *Ind Crops Prod*. 2014;60:39-44. doi: 10.1016/j.indcrop.2014.05.049.

Ferreira VF, Pinto AC. A fitoterapia no mundo atual. *Quim Nova*. 2010;33(9):1829. doi: 10.1590/S0100-40422010000900001.

Figueira LW. Efeito do extrato de *Curcuma longa* L. sobre infecções in vitro por *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* em macrófagos murinos (RAW 264.7) [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2017.

Fio FDSD, Filho TRDM, Groppo FC. Resistencia bacteriana. *Rev Bras Med*. 2000;57(10):1129–40. doi: 10.4067/S0301-732X2002000200008.

Fonseca JF, Botelho ACF. Atividade antifúngica do extrato de folhas de *Psidium guajava* sobre leveduras do gênero *Candida*. *Rev Fac Odont Porto Alegre*. 2010 jan;51(1):24-6

Gabriel I, Rychłowski M. Consequences of lysine auxotrophy for *Candida albicans* adherence and biofilm formation. *Acta Biochim Pol*. 2017;64(2):323–9. doi: 10.18388/abp.2016_1427. PMID: 28376133.

Ghosh A, Das BK, Roy A, Mandal B, Chandra G. Antibacterial activity of some medicinal plant extracts. *J Nat Med*. 2008 Apr;62(2):259-62. doi: 10.1007/s11418-007-0216-x. Epub 2007 Dec 5. PubMed PMID: 18404337.

Gutiérrez RMP, Mitchell S, Solis RV. *Psidium guajava*: a review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *J Ethnopharmacol*. 2008;117(1):1–27. doi: 10.1016/j.jep.2008.01.025. PMID: 18353572.

Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol* 2000. 1994;5(1):78–111. doi: 10.1111/j.1600-0757.1994.tb00020.x. PMID: 9673164.

Haynes K. Virulence in *Candida* species. *Trends Microbiol*. 2001;9(12):591–6. doi: 10.1016/S0966-842X(01)02237-5. PMID: 11728872.

Herigstad B, Hamilton M, Heersink J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *J Microbiol Methods*. 2001 Mar 1;44(2):121-9. PubMed PMID: 11165341.

Järvensivu A, Hietanen J, Rautemaa R, Sorsa T, Richardson M. Candida yeasts in chronic periodontitis tissues and subgingival microbial biofilms in vivo. *Oral Dis*. 2004;10(2):106–12. doi: 10.1046/j.1354-523X.2003.00978.x. PMID: 14996281.

Kamma JJ, Nakou M, Gmür R, Baehni PC. Microbiological profile of early onset/aggressive periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol*. 2004;19(5):314–21. doi: 10.1111/j.1399-302x.2004.00161.x. PMID: 15327644.

Kornman KS. Mapping the pathogenesis of periodontitis: a new look. *J Periodontol*. 2008 Aug;79(8 Suppl):1560-8. doi: 10.1902/jop.2008.080213. Review. PubMed PMID: 18673011.

Kumar P, Ansari SH, Ali J. Herbal remedies for the treatment of periodontal disease- a patent review. *Recent Pat Drug Deliv Formul*. 2009 Nov;3(3):221-8. Review. PubMed PMID: 19925444.

Lemes HP. Utilização de métodos não invasivos para avaliação da segurança de fitocosmético contendo extrato de goiaba para aplicação tópica [monografia]. Araraquara (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Farmacêuticas; 2015

Lindhe J, Lang NP, Karring T. *Clinical periodontology and implant dentistry*. Chichester, West Sussex Ames, Iowa: Wiley Blackwell; 2013. 1480p. ISBN: 978-0-470-67248-8.

Lindhe J, Lang NP, Karring T. *Periodontología clínica e implantología odontológica*. Estados Unidos: Wiley-Blackwell; 2009.

Liu RH, Adom KK. Whole grain phytochemicals and antioxidant activity. In: Liu RH. *Whole grains heal*. Estados Unidos: Wiley-Blackwell; 2007. 185–208 ISBN:9780813807775.

Loureiro CCS, Adde CA, Perez FEG, Penha SS. Efeitos adversos de medicamentos tópicos e sistêmicos na mucosa bucal. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2004;70(1):106–11. doi: 10.1590/S0034-72992004000100018.

Marini D, Mensch R, Freiburger MB, Dartora J, Franzener G, Garcia RC, et al. Efeito antifúngico de extratos alcoólicos de própolis sobre patógenos da videira. *Arq Inst Biol*. 2012;79(2):305–8.

Martínez J, Molina N, Bittencourt E. Evaluación de la actividad antimicrobiana del *Psidium guajava* L. *Rev Cubana Plant Med* 1997;2(1):12–4.

Mehta VV, Rajesh G, Rao A, Shenoy R, Mithun Pai BH. Antimicrobial efficacy of *Punica Granatummesocarp*, *Nelumbo nucifera* leaf, *Psidium Guajava* leaf and *Coffea*

Canephora extract on common oral pathogens: an in-vitro study. *J Clin Diagnostic Res.* 2014;8(7):65–8. doi: 10.7860/JCDR/2014/9122.4629. PMID: 25177642.

Menezes TODA, Alves ACBA, Vieira JMDS, Menezes SAF De, Alves BP, Mendonça LCDV. Avaliação in vitro da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos de plantas da região amazônica sobre cepa de *Candida albicans*. *Rev Odontol Da UNESP.* 2009;38(3):184–91.

Morais-Braga MFB, Carneiro JNP, Machado AJT, Sales DL, dos Santos ATL, Boligon AA, et al. Phenolic composition and medicinal usage of *Psidium guajava* Linn.: antifungal activity or inhibition of virulence. *Saudi J Biol Sci.* 2017;24(2):302–13. doi: 10.1016/j.sjbs.2015.09.028. PMID: 28149166.

Morais-Braga MFB, Sales DL, Carneiro JNP, Machado AJT, dos Santos ATL, de Freitas MA, et al. *Psidium guajava* L. and *Psidium brownianum* Mart ex DC.: Chemical composition and anti - *Candida* effect in association with fluconazole. *Microb Pathog.* 2016;95:200–7. doi: 10.1016/j.micpath.2016.04.013. PMID: 27085299.

Munusamy K, Vadivelu J, Tay ST. A study on candida biofilm growth characteristics and its susceptibility to aureobasidin A. *Rev Iberoam Micol.* 2018 Apr - Jun;35(2):68-72. doi: 10.1016/j.riam.2017.07.001. Epub 2018 Mar 12. PubMed PMID: 29544734.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. NCCLS document M27-A2: método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade a terapia antifúngica das leveduras. 2. ed. Pennsylvania: NCCLS; 2002. ISBN 1-56238-469-4

Ngwoke KG, Odimegwu DC, Esimone CO. Antimicrobial natural products. *Sci against Microb Pathog Commun Curr Res Technol Adv.* 2011;2:1011–26.

Padula M, Rodriguez-Amaya DB. Characterisation of the carotenoids and assessment of the vitamin a value of Brazilian guavas (*Psidium guajava* L.). *Food Chem.* 1986;20(1):11–9. doi: 10.1016/0308-8146(86)90163-9.

Papapanou PN. Population studies of microbial ecology in periodontal health and disease. *Ann Periodontol.* 2002;7(1):54–61. doi: 10.1902/annals.2002.7.1.54. PMID: 16013217.

Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol.* 2001;183(12):3770–83. doi: 10.1128/. PMID: 11371542.

Pereira CA, Vilela PGF, Oliveira LD, Jorge AOC. Ação antimicrobiana in vitro de extratos glicólicos de *Psidium guajava* L., *Syzygium cumini* L., e *Pimpinella anisum* L. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 2009;68(1):102-8.

Pereira JV, Pereira MDSV, Higino JS, Sampaio FC, Alves PM, Araújo CRF. Estudos

com o extrato da *Punica granatum* Linn. (Romã): efeito antimicrobiano in vitro e avaliação clínica de um dentifrício sobre microrganismos do biofilme dental. *Rev Odonto Ciênc.* 2005;20(49):262–9. doi: 10.1590/S0102-695X2006000100016.

Piva E, Barbosa JDO, Rossoni RD, Vilela SFG, Jorge AOC, Junqueira JC. Interação entre *Escherichia coli* e *Candida albicans* em biofilmes formados in vitro: análise da viabilidade celular por método colorimétrico. *Rev Odontol Da UNESP.* 2011;40(5):222–7.

Ramage G, Vande Walle K, Wickes BL, López-Ribot JL. Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001 Sep;45(9):2475-9. PubMed PMID: 11502517; PubMed Central PMCID: PMC90680.

Sangalli J, Júnior EGJ, Bueno CRE, Jacinto RC, Sivieri-Araújo G, Filho JEG, Cintra LTÁ, Junior ED. Antimicrobial activity of *Psidium cattleianum* associated with calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*: an in vitro study. *Clin Oral Investig.* 2018 Jul;22(6):2273-79. doi: 10.1007/s00784-017-2326-5. Epub 2018 Jan 9. PubMed PMID: 29318387.

Santos S, Loberto J, Martins C, Jorge A. Prevalência e sensibilidade in vitro de enterobacteriaceae e pseudomonas isoladas da cavidade bucal e bolsa periodontal de pacientes com periodontite crônica. *Braz Dent Sci.* 2002;5(2):74–83.

Silva DDEF, Lima EDEO. Análise do efeito antifúngico da própolis sobre espécies de *Candida albicans*. *Uningá Review.* 2017;30(3):45–51.

Silva MIG, Gondim APS, Nunes IFS, Sousa FCF. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). *Rev Bras Farmacogn.* 16(4):455-62, Out./Dez: 2006. doi: 10.1590/S0102-695X2006000400003.

Socransky SS, Haffajee AD, Goodson JM, Lindhe J. New concepts of destructive periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1984;11:21–32. doi: 10.1111/j.1600-051X.1984.tb01305.x. PMID: 6582072.

Socransky SS, Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J Periodontol.* 1992;63(4s):322–31. doi: 10.1902/jop.1992.63.4s.322. PMID: 1573546.

Somu CA, Ravindra S, Ajith S, Ahamed MG. Efficacy of a herbal extract gel in the treatment of gingivitis: a clinical study. *J Ayurveda Integr Med.* 2012 Apr;3(2):85-90. doi: 10.4103/0975-9476.96525. PubMed PMID: 22707865; PubMed Central PMCID: PMC3371564.

Vieira CAP, Magalhães CB, Hartenbach FARR, Martins do Souto R, Maciel da Silva-Boghossian C. Periodontal-disease-associated biofilm: a reservoir for pathogens of medical importance. *Microb Pathog.* 2015;94:27–34. doi:

10.1016/j.micpath.2015.09.009. PMID: 26416306.

Yagiela JA. Adverse drug interactions in dental practice: interactions associated with vasoconstrictors. Part V of a series. *J Am Dent Assoc.* 1999 May;130(5):701-9. Review. PubMed PMID: 10332135.

Yunes RA, Pedrosa RC, Filho VC. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. *Quim Nova.* 2001;24(1):147-52. doi: 10.1590/S0100-40422001000100025. PMID: 25246403.

Zomorodian K, Haghighi NN, Rajaei N, Pakshir K, Tarazooie B, Vojdani M, et al. Assessment of candida species colonization and denture-related stomatitis in complete denture wearers. *Med Mycol.* 2011 Feb;49(2):208-11. doi: 10.3109/13693786.2010.507605. Epub 2010 Aug 26. PubMed PMID: 20795762.