



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

LARA STEFFANY DE CARVALHO

**ATIVIDADE ANTIBIOFILME DO EXTRATO DE *Psidium guajava*
L. sobre *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans***

LARA STEFFANY DE CARVALHO

**ATIVIDADE ANTIBIOFILME DO EXTRATO DE *Psidium guajava*
L. sobre *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans***

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 CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE BUCAL.

Área: Microbiologia e Imunologia. Linha de pesquisa: Agentes antimicrobianos e métodos de controle para infecções de interesse médico-odontológico.

Orientadora: Profa. Tit. Luciane Dias de Oliveira

Coorientadora: Profa. Dra. Vanessa Marques Meccatti Domiciano

São José dos Campos

2025

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2025]. 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).

De Carvalho, Lara Steffany
Atividade antibiofilme do extrato de *Psidium guajava* L. sobre
Enterococcus faecalis e *Candida albicans* / Lara Steffany De Carvalho. - São
José dos Campos : [s.n.], 2025.
69 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal -
Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Ciência e Tecnologia,
São José dos Campos, 2025.
Orientador: Luciane Dias De Oliveira
Coorientador: Vanessa Marques Meccatti-domiciano

1. *Psidium guajava* L. 2. *Candida albicans*. 3. *Enterococcus faecalis*. 4.
Biofilme. 5. Fitoterapia. I. De Oliveira, Luciane Dias, orient. II. Meccatti-
domiciano, Vanessa Marques, coorient. III. Universidade Estadual Paulista
(UNESP), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV.
Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - UNESP. V.
Universidade Estadual Paulista (UNESP). VI. Título.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

Devido ao aumento constante de casos relatados pela literatura de infecções endodônticas persistentes associadas a *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*, é cada vez mais necessário o estudo de métodos alternativos aos utilizados atualmente a fim de combater esses microrganismos, consequentemente aumentando as taxas de sucesso do tratamento endodôntico. Diante disso, a fitoterapia pode ser uma alternativa promissora devido às suas propriedades medicinais, tais como anti-inflamatórias, antimicrobiana, antibiofilme entre outras. Analisar o efeito antibacteriano de extratos de plantas é de suma importância e pode futuramente contribuir para novas formulações terapêuticas e/ou integrativas de tratamento. Este estudo demonstra resultados promissores da ação antibacteriana e antibiofilme do extrato hidroetanólico de *Psidium guajava* frente cepas ATCC e clínicas de *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*, bem como uma importante ação antioxidante e ausência de citotoxicidade na faixa de concentração testadas.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

Due to the constant increase in cases in the literature of persistent endodontic infections associated with *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*, it is increasingly necessary to study alternative methods to those currently used in order to combat these microorganisms, consequently increasing the success rates of endodontic treatment. Therefore, phytotherapy may be a promising alternative due to its medicinal properties, such as anti-inflammatory, antimicrobial, antibiofilm, among others. Analyzing the antibacterial effect of plant extracts is of paramount importance and may contribute to new therapeutic and/or integrative treatment formulations in the future. This study demonstrates promising results of the antibacterial and antibiofilm action of the hydroethanolic extract of *Psidium guajava* against ATCC and clinical strains of *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*, as well as an important antioxidant action and absence of cytotoxicity in the concentration range tested.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Tit. Luciane Dias de Oliveira (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Maira Terra Garcia

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. Enrico Coser Bridi

Faculdade São Leopoldo Mandic (SLMANDIC)

Faculdade de Odontologia e Medicina

Campus de Campinas

São José dos Campos, 21 de fevereiro de 2025

DEDICATÓRIA

Primeiramente a **Deus**, por tantas bênçãos concebidas na minha vida. Por ter me abençoado com saúde, sabedoria e discernimento durante todo o período de mestrado. A Deus toda honra e glória sempre.

Aos meus pais, **Julia e Sebastião** que sempre me apoiaram em todas as minhas decisões e nunca mediram esforços para que meus sonhos fossem realizados. Por estarem comigo em todos os momentos da minha vida e me mandarem boas energias mesmo de longe, sempre se fazendo presente. O apoio de vocês foi essencial nessa trajetória. Amo muito vocês.

Ao meu marido **Amjad**, o meu maior incentivador para entrar no mestrado e meu grande incentivador durante todos esses dois anos. Agradeço a paciência em me ensinar, por aguentar meus surtos e desabaços diários e por me dar muito mais do que apoio moral, mas principalmente apoio científico. Apesar de tanto estresse, confesso que amei dividir o fluxo e os alunos de ic com você. Te amo sem fim.

A minha família, avós, madrinhas, padrinhos, tias, tios e primos que sempre torceram e torcem por mim. Que acompanharam de perto toda a minha luta e dedicação durante essa trajetória mesmo morando em um estado diferente.

As minhas amigas de vida **Ana Laura, Marina, Luma e as duas Naths**, só tenho a agradecer pela amizade de vocês, vocês são muito mais do que minhas amigas e sim minha família do coração.

Aos meus amigos de laboratório **Tuana, Raquel, Luma, Leticia e Geovani**. Os responsáveis por deixar a pós-graduação mais leve e divertida. Até os extratos mais fraquinhos que não tinham Concentração Bactericida Mínima nos tiravam boas gargalhadas.

Aos amigos que a Unesp me deu **Clarissa, Caroline, Adriane, Marília, Leticia, Anderson, Juliana, Eduardo e Camila**.

Aos meus queridos alunos de Iniciação Científica, **Karoline, Livia, Lais, Guilherme, Clara, Larissa, Carol, Dyovana, Gabriel, Julia, Victória, Ana Clara e Vitória**. Que durante esses dois anos muito mais do que aprenderam comigo, mas me fizeram entender o que é a docência, o que é ensinar e coorientar.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Unesp, na pessoa do diretor do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, **Profº Tit. Cesar Rogério Pucci** e da vice-diretora **Profa. Dra. Symone Cristina Teixeira**.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal, na pessoa de coordenador **Prof. Tit. Alexandre Luiz Souto Borges**.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal.

A minha querida orientadora, **Profa. Tit. Luciane Dias de Oliveira**, que faz a sua função com muita maestria dentro desta universidade. Foi lindo acompanhar de perto sua dedicação e excelência em ensinar. Com toda certeza é fonte de inspiração.

A minha coorientadora **Profa. Dra. Vanessa Marques M. Domiciano**, que a conheci ainda como doutoranda e hoje posso vê-la realizando esse sonho de ser docente no lugar que sempre foi a sua casa.

As professoras **Tit. Luana Marotta Reis de Vasconcelos**, **Assoc. Andrea Carvalho de Marco**, **Dra. Marianne Spalding**, **Dra. Maira Terra Garcia** com quem tive o prazer de trabalhar, desenvolver parcerias e receber tanto carinho e atenção. Obrigada.

A Profa. **Dra. Maria Cristina Marcucci Ribeiro**, por todo suporte dado durante a execução do trabalho. Professora que se dedica de corpo e alma a pesquisa e que é um exemplo para mim.

Ao Prof. **Dr. Enrico Coser Bridi**, que foi meu professor de graduação e agora com tanto carinho aceitou compor a banca tanto do meu Exame Geral de Qualificação quanto da minha defesa de mestrado, meu muito obrigada.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da Bolsa de Mestrado no período de 01/03/2023 a 21/02/2025.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (Capes) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

Carvalho LS. Atividade antibiofilme do extrato de *Psidium guajava* L. sobre *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* [dissertação] São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2025.

A resistência microbiana é um fator preocupante na saúde mundial, inclusive no campo da odontologia. Os microrganismos *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* estão normalmente relacionados ao insucesso do tratamento endodôntico devido à resistência aos meios de descontaminação. Esse trabalho objetivou: I) produzir e avaliar fitoquimicamente o extrato de *Psidium guajava* L. (goiabeira); II) Avaliar a ação antimicrobiana e antibiofilme sobre cepas ATCC e clínicas de *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*, comparando com hipoclorito de sódio e clorexidina; III) avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade do extrato em linhagem de queratinócitos humanos (HaCaT). Para tanto, o extrato foi preparado e caracterizado fitoquimicamente por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-DAD), a ação antioxidante foi avaliada e o teor de flavonoides e fenóis determinados. A atividade antimicrobiana foi analisada pelo teste de microdiluição em caldo (CLSI M27-S4 para *C. albicans*) e (CLSI M7-A9 para *E. faecalis*) para determinar concentração inibitória mínima (CIM) e concentração microbicida mínima (CMM). As concentrações mais efetivas foram analisadas em biofilmes monotípicos formados em 48 horas que foram tratados com o extrato de *P. guajava* L. pelo tempo de contato de 10 minutos e quantificada a viabilidade pelo teste colorimétrico de MTT. A linhagem de queratinócitos humanos (HaCaT) foi utilizada para avaliação de citotoxicidade e genotoxicidade, com o emprego do teste colorimétrico de Alamar Blue e micronúcleos, respectivamente. Os dados foram analisados por Anova one-way e Tukey ou Kruskal Wallis e Dunn considerando o nível de significância ($p \geq 0,05$), de acordo com o teste de normalidade. A análise cromatográfica mostrou picos de rutina, quercitina e kaempferol no extrato vegetal e para eliminar 50% dos radicais livres é necessário 10,39 $\mu\text{g/mL}$ do mesmo. O teor de sólidos solúveis foi quantificado em 3,35%, a concentração de flavonoides foi de 0,130 mg/mL e 1,770 de fenóis. O extrato apresentou ação bactericida e antifúngica contra todas as cepas estudadas, sendo a CMM de 1,0 mg/mL para *E. faecalis* ATCC e clínica (cepa 4), de 2,0 mg/mL para *E. faecalis* clínica (cepa 2), *C. albicans* clínica (cepas 14 e 60) e 8,3 mg/mL para *C. albicans* ATCC. Na análise antibiofilme a concentração de 8,3 mg/mL demonstrou porcentagens de redução acima de 50% para todas as cepas estudadas. Sendo as melhores porcentagens de redução de biofilme obtidas na concentração de 8,3 mg/mL que reduziu 69,27% do biofilme e 2 mg/mL que reduziu 61,24% ambos para *E. faecalis* clínica (cepa 4). O extrato de *P. guajava* L. não foi citotóxico e nem produziu alteração no material genético dos queratinócitos. Portanto é possível concluir que o extrato de *P. guajava* L. possui ação antimicrobiana e antibiofilme sobre *E. faecalis* e *C. albicans*, possui boa ação antioxidante e não é citotóxico, nem genotóxico para queratinócitos humanos (Hacat).

Palavras-chave: *Psidium guajava* L.; *Candida albicans*; *Enterococcus faecalis*; biofilme; fitoterapia.

ABSTRACT

Carvalho LS. Antibiofilm activity of Psidium guajava L. extract on Enterococcus faecalis and Candida albicans. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2025.

Antimicrobial resistance is a concern in global health, including in the field of dentistry. The microorganisms Enterococcus faecalis and Candida albicans are usually related to the failure of endodontic treatment due to resistance to decontamination agents. This study aimed to: I) produce and phytochemically evaluate the extract of Psidium guajava L. (guava); II) evaluate the antimicrobial and antibiofilm action on ATCC and clinical strains of Enterococcus faecalis and Candida albicans, comparing it with sodium hypochlorite and chlorhexidine; III) evaluate the cytotoxicity and genotoxicity of the extract in human keratinocyte cell lines (HaCaT). For this purpose, the extract was prepared and phytochemically characterized by high-performance liquid chromatography (HPLC-DAD), the antioxidant action was evaluated, and the content of flavonoids and phenols were determined. The antimicrobial activity was analyzed by the broth microdilution test (CLSI M27-S4 for C. albicans) and (CLSI M7-A9 for E. faecalis) to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum microbicidal concentration (MMC). The most effective concentrations were analyzed in monotypic biofilms formed in 48 hours that were treated with P. guajava L. extract for a contact time of 10 minutes and the viability was quantified by the MTT colorimetric test. The human keratinocyte cell line (HaCaT) was used to evaluate cytotoxicity and genotoxicity, using the Alamar Blue colorimetric test and micronucleus, respectively. The data were analyzed by one-way ANOVA and Tukey or Kruskal Wallis and Dunn considering the significance level ($p \geq 0.05$), according to the normality test. The chromatographic analysis showed peaks of rutin, quercetin and kaempferol in the plant extract and to eliminate 50% of the free radicals, 10.39 $\mu\text{g/mL}$ of the same is necessary. The content of soluble solids was quantified at 3.35%, the concentration of flavonoids was 0.130 mg/mL and 1.770 of phenols. The extract showed bactericidal and antifungal action against all the strains studied, with the MMC of 1.0 mg/mL for E. faecalis ATCC and clinical (strain 4), 2.0 mg/mL for E. faecalis clinical (strain 2), C. albicans clinical (strains 14 and 60) and 8.3 mg/mL for C. albicans ATCC. In the antibiofilm analysis, the concentration of 8.3 mg/mL demonstrated reduction percentages above 50% for all strains studied. The best biofilm reduction percentages were obtained at the concentration of 8.3 mg/mL , which reduced 69.27% of the biofilm, and 2 mg/mL , which reduced 61.24%, both for clinical E. faecalis (strain 4). The P. guajava L. extract was not cytotoxic and did not produce changes in the genetic material of keratinocytes. Therefore, it is possible to conclude that the P. guajava L. extract has antimicrobial and antibiofilm action on oral microorganisms, has good antioxidant action and is not cytotoxic or genotoxic for human keratinocytes (Hacat).

Keywords: Psidium guajava L. Candida albicans; Enterococcus faecalis; biofilm; phytotherapy.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Hipoclorito de sódio e clorexidina como agentes antimicrobianos	18
2.2 Fitoterápicos como agentes antimicrobianos de interesse endodôntico	23
3 PROPOSIÇÃO	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 Produção do extrato vegetal	28
4.1.1 Avaliação da composição fitoquímica por HPLC.....	29
4.1.2 Determinação da atividade supressora de radicais livres do extrato hidroetanólico de <i>P. guajava</i> L. (atividade antioxidante).....	29
4.1.3 Teor de sólidos solúveis.....	30
4.1.4 Determinação dos flavonoides totais	31
4.1.5 Determinação do teor de fenóis totais.....	31
4.2 Avaliação da atividade antimicrobiana e antibiofilme	32
4.2.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM) do extrato <i>Psidium guajava</i> L.	32
4.2.2 Avaliação da ação antibiofilme dos grupos experimentais por meio da análise de MTT	34
4.3 Avaliação da citotoxicidade do extrato de <i>P. guajava</i> L.....	36
4.4 Avaliação da genotoxicidade do extrato de <i>P. guajava</i> L.....	37
4.5 Análise estatística	39
5 RESULTADOS	40
5.1 Avaliação da composição fitoquímica por HPLC.....	40
5.1.1 Determinação da atividade supressora de radicais livres do extrato hidroetanólico de <i>P. guajava</i> L. (atividade antioxidante)	41
5.1.2 Teor de sólidos solúveis.....	41
5.1.3 Determinação dos flavonoides totais	42
5.1.4 Determinação do teor de fenóis totais.....	43

5.2 Avaliação da atividade antimicrobiana e antibiofilme	44
5.2.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbica Mínima (CMM) do extrato <i>P. guajava</i> L.....	44
5.2.2 Avaliação da ação antibiofilme dos grupos experimentais por meio da análise de MTT	44
5.3 Avaliação da citotoxicidade do extrato de <i>P. guajava</i> L.	51
5.4 Avaliação da genotoxicidade do extrato de <i>P. guajava</i> L.....	52
6 DISCUSSÃO	54
7 CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

A infecção endodôntica é dividida em três tipos, primária, secundária e persistente, sendo que é atribuída a uma variedade de microrganismos, assim o perfil dos microrganismos difere entre os três tipos incluindo bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, aeróbias e anaeróbias (Endo et al., 2013; Narayanan & Vaishnavi, 2010) apresentando diferentes graus de virulência (Machado et al., 2020), além de presença detectada de archaea, vírus e fungos (Siqueira, José F & Rôças, 2022).

O sucesso do tratamento endodôntico depende da efetiva remoção destes microrganismos presentes no interior do sistema dos canais radiculares (Barbosa-Ribeiro et al., 2020). Assim, o tratamento endodôntico é feito por meio de limpeza e modelagem, (Schilder, 1974) usando instrumentos endodônticos manuais/automatizados promovendo ação mecânica sobre a infecção, juntamente com a ação de substâncias químicas como as soluções irrigadoras e medicações intracanaís são responsáveis pela descontaminação química intracanal (Abu Hasna et al., 2020).

Porém, vários estudos têm mostrado que alguns microrganismos são capazes de persistir ao processo de descontaminação e recontaminar o sistema de canais radiculares, levando assim a necessidade de uma reintervenção clínica (Bucchi et al., 2022; Karaoğlu et al., 2022; Ng et al., 2011). A principal razão pelo insucesso no tratamento endodôntico é a presença de microrganismos persistentes devido a um preparo biomecânico deficiente ou o preenchimento inadequado do sistema dos canais radiculares, causando uma infecção persistente (Salehrabi & Rotstein, 2010). Para que um microrganismo sobreviva dentro de um canal selado, este deve suportar os meios de desinfecção como o preparo biomecânico, as medicações intracanal e se adaptar com a baixa fonte de nutrientes. Portanto poucas bactérias resistem a essas condições descritas (Prada et al., 2019). Já que nem todas vão conseguir sobreviver a essas condições extremas e causar o insucesso no tratamento. Isso só ocorrerá se as toxinas dessas bactérias forem patogênicas e conseguirem perpetuar lesões perirradiculares (Pereira et al., 2017).

Enterococcus faecalis é uma bactéria aeróbia facultativa Gram-positiva, é presente nas infecções endodônticas primárias e persistentes/secundárias devido à

sua resistência a agente antimicrobianos, capacidade de adaptação a mudanças ambientais severas e capacidade de invadir profundamente os túbulos dentinários tolerando a falta de nutrientes (Machado et al., 2020). Além disso, *E. faecalis* é encontrado entre os patógenos hospitalares multirresistentes mais prevalentes. (Yadav et al., 2022). É uma das causas mais comuns em infecções hospitalares, causando infecções graves de alto inóculo, conhecida como endocardite infecciosa. Doença de difícil tratamento, visto que o tratamento se baseia no uso de antibióticos e é preciso considerar a alastrada resistência antimicrobiana (Beganovic et al., 2018).

Além disso, o sistema dos canais radiculares não está livre da presença de espécies fúngicas, como *Candida albicans* que foi descrita com 8,2% de prevalências em infecções primárias e 20% em infecções endodônticas secundárias, estando assim diretamente relacionada ao fracasso do tratamento endodôntico (Pourhajibagher et al., 2017). *C. albicans* possui capacidade de se ligar à dentina, formar biofilmes e invadir os túbulos dentinários, por conta de suas propriedades tigmotróficas, resistindo aos irrigantes antimicrobianos utilizados durante o tratamento endodôntico (Yoo et al., 2020, 2017). *C. albicans* é o fungo mais comumente isolado de canais radiculares infectados (Mergoni et al., 2018), e é capaz de se aderir firmemente ao esmalte normal ou previamente tratado com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e hipoclorito de sódio (NaOCl), dentina e superfícies de cimento, possuindo boa afinidade pela hidroxiapatita (Alberti et al., 2021).

É relatado na literatura a possível capacidade de *C. albicans* utilizar a própria dentina como fonte de nutrição e colonizar as paredes do canal radicular, assim como os túbulos dentinários (Siqueira, José F et al., 2002), além disso, a presença da *smear layer* produzida pela instrumentação endodôntica facilita a penetração de *C. albicans* nos túbulos dentinários, tornando ainda mais difícil ação do irrigante antimicrobiano. (Waltimo et al., 2004).

Hipoclorito de sódio (NaOCl) e digluconato de clorexidina (CHX) são substâncias químicas amplamente utilizadas como solução irrigadora na endodontia. Apesar da ampla ação antimicrobiana e a capacidade de dissolução do NaOCl usado como solução irrigante, este possui citotoxicidade contra o tecido periapical e forte capacidade oxidante, prejudicando as propriedades mecânicas da dentina (Cai et al., 2023).

Algumas soluções irrigadoras são habitualmente utilizadas durante o

tratamento endodôntico com eficácia variada. Apesar de comprovada a alta ação da CHX como antimicrobiano, esta falhou em reduzir o biofilme em um estudo *in vitro* usando dentes humanos extraídos para *E. faecalis*. Já o NaOCl consegue reduzir biofilme, mas é irritante aos tecidos periapicais (Kayaoglu et al., 2011), portanto torna-se interessante a busca de novas soluções irrigadoras para o tratamento endodôntico.

A fitoterapia vem sendo estudada como forma de combate as bactérias e fungos diretamente relacionados as infecções endodônticas e mostrando resultados relevantes (Parolia et al., 2021; Valera et al., 2010; Domingues et al., 2023). As plantas medicinais têm cada vez mais um futuro promissor na área da endodontia. *Psidium guajava* L., conhecida popularmente como goiabeira, é um arbusto nativo americano que cresce em ambientes tropicais em todo o mundo (Gutierrez-Montiel et al., 2023). O consumo mundial da goiaba e suas propriedades medicinais fazem com que ela seja a mais importante entre as frutas tropicais menores. Somando uma produção mundial de 2,3 milhões de toneladas por ano, sendo o Brasil o quinto maior produtor mundial (Arévalo-Marín et al., 2021). Esta planta possui muitas aplicações para tratar diversas doenças associadas ao estômago, ao tratamento de diabetes mellitus, doenças cardiovasculares, absorção intestinal de sódio, infecções parasitárias tornando, assim, relevante o estudo desta planta (Tousif et al., 2022; Zhang et al., 2024; de Assis et al., 2025).

P. guajava L. é relatada pela literatura por suas diversas atividades biológicas comprovadas *in vitro* e *in vivo* (Chechani et al., 2024). Entretanto não foram encontrados na literatura consultada estudos que relacionem o extrato de *P. guajava* L. com cepas clínicas de *E. faecalis* e *C. albicans* em biofilmes com o intuito de apresentar soluções coadjuvantes as soluções irrigadoras já comercializadas. Devido a resistência antimicrobiana cada vez mais frequente, pesquisas têm sido feitas para promover a associação de medicamentos, aos quais já existam relatos de resistência, com produtos naturais na forma de extratos (Calixto Júnior et al., 2015). Embasados nesses relatos o extrato de goiabeira se mostra promissor, necessitando de estudos que comprovem sua possível ação antibiofilme com cepas clínicas de *E. faecalis* e *C. albicans*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Hipoclorito de sódio e clorexidina como agentes antimicrobianos

O hipoclorito de sódio (NaOCl) é o padrão ouro quando se fala de irrigantes para o canal radicular devido a sua potente ação antimicrobiana contra uma variedade das bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, aeróbias e anaeróbias, além de ter uma ação anti-endotoxinas. O mesmo é capaz de dissolver os tecidos orgânicos do tecido pulpar, no entanto, esse irrigante possui alta citotoxicidade, sendo capaz de causar danos irreversíveis aos tecidos moles e tecidos perirradiculares (Al-Madi et al., 2019; Vivekananda Pai, 2023). Devido a essas imperfeições o NaOCl é muito estudado e comparado com diversas outras substâncias na literatura desde o século XIX.

Em 1976, um estudo buscava avaliar a ação antibacteriana das soluções irrigadoras disponíveis na época, NaOCl a 0,5% e 5,0%. Para o experimento foram utilizados três grupos de dentes humanos, as amostras foram coletadas dos canais radiculares após a remoção do tecido necrótico e a limpeza completa. Cada amostra foi transferida para meios líquidos e sólidos e incubada até o crescimento ou até 10 dias. O efeito do grupo tratado com solução salina estéril foi muito baixo (9%), enquanto com NaOCl foi de (25%), não apresentando diferença estatísticas entre o hipoclorito 0,5% e 5,0% (Cvek et al., 1976).

Quando avaliada a dissolução do tecido pulpar, foi comprovado que NaOCl nas concentrações de 5% e 2,5% apresentaram a maior capacidade de dissolver o tecido pulpar e a diluição para 0,5% diminuiu significativamente sua eficácia. Para chegar a essa conclusão, o material dissolvido foi analisado quanto a hidroxiprolina (HYO) e fosfato total (Koskinen et al., 1980).

Um estudo que avaliou o efeito antimicrobiano dos irrigantes endodônticos em que dentes bovinos foram infectados com *E. faecalis*, *Streptococcus sanguinis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* por 14 dias. O grau de infecção dos túbulos dentinários foi monitorado usando coloração de Brown & Brenn e microscopia eletrônica de varredura (MEV). *E. faecalis* foi a bactéria que infectou mais rapidamente toda a extensão dos túbulos dentinários e de forma mais intensa, também foi a única

que persistiu por pelo menos 10 dias após a retirada do suporte nutricional, enquanto os outros três microrganismos morreram dentro de 4 a 48 horas. Dos irrigantes testados o iodeto de potássio e iodo foram mais potentes que o NaOCl e a CHX (Orstavik & Haapasalo, 1990).

Ainda no mesmo século avaliou-se a atividade antimicrobiana do NaOCl 2,5% e da CHX 0,2% isolados e combinados. Para o estudo foram utilizados dez dentes para cada grupo experimental e solução salina 0,9% como grupo controle. Foi possível concluir que o uso de NaOCl e CHX combinados no canal radicular resultou em um maior percentual de redução de culturas de bactérias. Resultado da formação de cloreto de clorexidina que aumenta a capacidade ionizante da molécula de clorexidina. Apresentando semelhança significativa ao uso isolado de NaOCl e não significativa com o uso isolado de CHX (Kuruvilla & Kamath, 1998). Esses achados foram preliminares, anos depois foi revelado que o uso combinado desses dois irrigantes não é recomendado devido a formação do precipitado para-cloroanilina (Basrani et al., 2007), uma substância citotóxica, genotóxica, carcinogênica, e de difícil remoção do canal radicular (Jeong et al. 2021).

Em relação a concentração do NaOCl, um estudo foi realizado a fim de comparar a atividade antibacteriana das diferentes concentrações de NaOCl a 1%, 2,5% e 5,25%. Para esse estudo foram utilizados 40 pré-molares unirradiculares inferiores humanos extraídos. Após os dentes serem preparados e padronizados, foram preenchidos com uma suspensão de *E. faecalis* e incubados a 37°C por 24 horas. Para controle foi utilizada a solução salina estéril a 0,85%. Após cumprir todo o protocolo endodôntico amostras de cada dente foram retiradas com uma ponta de papel absorvente que foi imediatamente transferida para tubos contendo solução salina e agitadas em vórtex por 1 minuto. Foram feitas diluições seriadas de 10 vezes em solução salina e alíquotas de 0,1 ml foram plaqueadas em ágar *Mitis salivarius* e incubadas a 37°C por 48 horas. As unidades formadoras de colônia (UFC/mL) foram então contadas. Após análise estatística utilizando o teste Anova não foram encontradas diferenças estatísticas entre as diferentes concentrações de NaOCl, no entanto foram significativamente mais eficazes que a solução salina quando comparado o número de células bacterianas dentro do canal radicular (Siqueira, J F et al., 2000).

Ainda em relação a diferentes concentrações de NaOCl, Radcliffe et al. (2004) tiveram como objetivo determinar a resistência de microrganismos relacionados a infecções endodônticas ao NaOCl em diferentes concentrações, 0,5% , 1,0%, 2,5% e 5,25% e diferentes tempos de contato 0,10,20,30,60 e 120 segundos. Fizeram parte do estudo cepas de *Actinomyces naeslundii*, *Candida albicans* e *E. faecalis*, para esta última cepa foram utilizados tempo de contato adicionais de 1, 2, 5, 10 e 30 minutos. Ao final do estudo foi possível concluir que todas as concentrações de NaOCl foram capazes de reduzir a UFC/mL para *A. naeslundii* e *C. albicans*. Já *E. faecalis* foi a cepa mais resistente ao NaOCl.

Ferreira et al. (2008) em um estudo *in vitro* testaram a ação isolada e combinada de NaOCl com CHX durante o preparo biomecânico de 28 incisivos inferiores unrradiculares. Os resultados mostraram que o grupo água destilada e CHX 0,2% foram estatisticamente semelhantes entre si, assim como o grupo NaOCl 2,5% e o grupo combinado de CHX e NaOCl, concluindo então que não há benefício na utilização dos irrigantes combinados, já que NaOCl sozinho é capaz de remover grande quantidade dos detritos dos canais radiculares. No ano seguinte, outro experimento foi feito, mas agora investigando a eficácia da combinação contra *E. faecalis* e os resultados obtidos mostraram que a maior taxa de crescimento de biofilme de *E. faecalis* foi com o grupo CHX 2,0% em gel. Os grupos que apresentaram maior taxa de inibição de biofilme foram NaOCl 1% e 2,5 % e CHX 2,0% na forma líquida, porém, a associação deles não melhorou a atividade antimicrobiana (Vianna & Gomes, 2009).

Essner et al. (2011) investigaram o efeito do NaOCl em células pulpares humanas, as células foram obtidas do tecido pulpar de terceiros molares sem história prévia de infecção. Para o estudo fez-se um estudo piloto capaz de determinar as concentrações não tóxicas de NaOCl que foram 0,33%, 0,16%, 0,08% e 0,04%. Células da polpa dos terceiros molares foram expostas a cada concentração de NaOCl por 5,10 e 15 minutos. Para controle foi utilizado solução salina tamponada com fosfato PBS. Quando expostas a baixas concentrações de NaOCl (0,04% e 0,08%) não apresentaram diferenças morfológicas significativas e nem alteração na capacidade proliferativa das células. Já quando expostas a (0,16% e 0,33%) sofreram alterações significativas na morfologia celular e na quantidade de células em todos os

tempos de tratamento. A maior taxa de morte celular foi na concentração de 0,33% de NaOCl no tempo de contato de 15 minutos.

No ano de 2013 foi publicado um estudo que comparava três fitoterápicos com o NaOCl a 5,2%, *Azadiracta indica*, *Morinda citrifolia* e chá verde. Neste estudo foram utilizados dentes unirradiculares extraídos, os dentes foram preparados e então foi inoculado *E. faecalis* nos canais radiculares. Cada grupo de tratamento foi colocado por um tempo de 30 minutos e solução salina foi o utilizada como grupo controle negativo. Para avaliação foi utilizado microscópio confocal de varredura a laser (MCVL). Os resultados mostraram que *A. indica* alcançou a redução máxima na adesão de *E. faecalis* na dentina (9,30%), depois NaOCl (12,50%), chá verde (27,30%), *M. citrifolia* (44,20%) e solução salina (86,70%) (Rosaline et al., 2013).

Em outro estudo foi comparado o uso da solução de NaOCl 6% com QMix 2 in 1, um irrigante a base de EDTA, clorexidina (CHX) e cetrimida. Também com SilverSol 10 ppm com 0,1% de H₂O₂, uma solução de nanopartículas de prata e com o HYBENX, que é uma mistura de ácido hidroxibenzenossulfônico, ácido hidroximetoxibenzenossulfônico e ácido sulfúrico. NaOCl 0,9% foi utilizado como grupo controle negativo neste estudo. Os grupos foram testados em dentes humanos e avaliados em MCVL, neste estudo foi possível relatar que a profundidade máxima de *E. faecalis* nos túbulos dentinários foi de 624 µm. O grupo que apresentou maior quantidade de bactérias mortas foi o NaOCl, seguido de QMix 2 em 1, HYBENX, SilverSol e NaOCL 0,9% respectivamente (Ye et al., 2018).

Para comparar a eficácia de soluções contendo nanopartículas de prata e óxido de zinco (ZnO Np) com irrigantes já comercializados atualmente, como NaOCl a 1% e 5%, CHX 2%. De Almeida et al. (2018) utilizaram a cepa de *E. faecalis* (ATCC 29212) para contaminar 76 pré-molares unirradiculares extraídos e não cariados. Após sete dias de formação de biofilme nos dentes já instrumentados e padronizados foram feitas as irrigações com as soluções citadas anteriormente. Em todos os grupos a solução irrigante foi ativada por ultrassom por 1 minuto. Imediatamente após o protocolo de irrigação três pontas de papel absorvente foram inseridas nos canais radiculares afim de conseguir posteriormente fazer a contagem de colônias. As análises estatísticas mostraram que a CHX 2% foi a mais eficaz, reduzindo cerca de 76,81% das UFC/mL, seguido de NaOCl 5% (70,02%), Ag Np (57,28%), ZnO Np 26% (56,65%) e por último NaOCl 1% (55,97%).

Outro irrigante comparado ao NaOCl e CHX por sua atividade antimicrobiana foi o hipoclorito de cálcio (CH). Os grupos experimentais foram testados em dentes humanos contaminados com *E. faecalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Prevotella intermedia*. Neste estudo foi possível concluir que CH a 5% e CHX a 5% foram mais eficazes que NaOCl a 5,25% na redução de biofilme misto (Shadmehr et al., 2019).

Ainda em 2019, foram analisados 60 dentes inoculados com *E. faecalis* e outros 60 dentes com *S. mutans*. Os grupos de dentes foram subdivididos em grupos utilizando diferentes métodos de desinfecção. Os dentes (n=10) foram tratados com laser de diodo, terapia fotodinâmica (TFD), NaOCl, um grupo com a combinação de NaOCl e laser diodo, uma combinação de NaOCl e TFD e por último, e como controle os dentes não receberam nenhum tratamento. A análise foi feita através de UFC/ml. Para ambas as cepas a combinação de um irrigante com laser diodo ou a TFD com azul de metileno proporcionou melhor eficácia na contagem de colônias bacterianas. A melhor porcentagem de redução foi encontrada com o uso do NaOCl a 3% juntamente com TFD (Sarda et al., 2019).

Mais recentemente, foi publicado um estudo sobre o uso de chalconas como irrigante de canal radicular. Chalconas se-tratam de núcleos de vários compostos biologicamente de fontes naturais, em outras palavras se trata de um flavonóide presente em plantas. Foram utilizados nesse estudo cepas ATCC de *E. faecalis* e *C. albicans*. O irrigante a base de aminochalconas demonstrou resultados significativos tanto para biofilmes monotípicos quanto mistos e não mostraram toxicidade quando testados em *Galleria mellonella* (Graciani et al., 2023).

Para avaliar o potencial antimicrobiano do NaOCl em concentrações, tempo e temperaturas diferentes, 40 dentes unirradiculares foram preparados e contaminados com *E. faecalis* isoladas de periodontite apical persistente. A capacidade antimicrobiana do NaOCl foi significativamente influenciada por sua concentração, temperatura e tempo de exposição do irrigante. Foi possível concluir que aumentar a temperatura do NaOCl e o tempo de exposição são mais eficazes do que aumentar sua concentração (Liu et al., 2024).

2.2. Fitoterápicos como agentes antimicrobianos de interesse endodôntico

Um estudo importante que avaliou o uso de fitoterápicos como solução irrigadora foi feito em dentes extraídos que foram cortados verticalmente de modo que o canal radicular ficasse em contato com o biofilme de *E. faecalis* em dois tempos de formação, 3 e 6 semanas. Os grupos de tratamento consistiam em solução de Triphala, uma mistura de três frutas medicinais indianas, como Haritaki, Amalaki e BiBitaki, que são fonte de vitamina C e possuem alto poder antioxidante, polifenóis do chá verde (GTP), que também possuem propriedades antioxidantes, termogênicas, capazes de reduzir o colesterol entre outras, o MTAD que é uma mistura de tetraciclina com ácido isômera e detergente, NaOCl 5% e solução salina para controle. Após três semanas os grupos foram tratados por 10 minutos com as soluções irrigadoras. Houve inibição completa do biofilme nos grupos tratados com Triphala, MTAD e NaOCl 5%, já GTP e solução salina não conseguiram romper biofilme. Porém, no biofilme formado em seis semanas apenas NaOCl a 5% mostrou inibição completa do biofilme, embora que Triphala, GTP e MTAD apresentaram redução bacteriana significativa quando comparados com a solução salina (Prabhakar et al. 2010).

Outro estudo comparou a eficácia antifúngica dos extratos de própolis, *Morinda citrifolia* (amora indiana), *Azadirachta indica* (Neem), com NaOCl a 5% e solução salina como controle negativo em biofilme formado por *C. albicans*. Foram utilizados pré-molares unirradiculares, seccionados verticalmente expondo a superfície do canal ao fungo para a formação de biofilme por 2 dias a 37°C. Cada grupo foi irrigado com 3 mL por 10 minutos. Após a contagem de colônias, observou-se que a eliminação completa do biofilme de *C. albicans* em 8 de 10 amostras dos grupos própolis e NaOCl. Na análise estatística todos os grupos apresentaram diferença estatística exceto a comparação entre própolis e NaOCl 5% (Tyagi et al. 2013).

Além disso, outro estudo avaliou a ação antimicrobiana do EndoPam, uma combinação dos extratos etanólicos de *S. aromaticum*, *C. zeylanicum*, *E. globulus* e *M. piperita*, contra cepa ATCC de *E. faecalis*. O EndoPam foi comparado ao NaOCl 2,5%, CHX 2% e solução salina estéril. Quarenta pré-molares inferiores extraídos foram preparados, instrumentados e esterilizados. Posteriormente foi inoculada

suspensão de *E. faecalis* padronizado a cada três dias durante três semanas. Após o tempo de inoculação os espécimes foram irrigados por dez minutos com cada grupo experimental, para o teste de difusão as amostras foram retiradas dos canais radiculares com ponta de papel absorvente. O teste de halo de inibição mostrou que o EndoPam exibiu zona de inibição comparável ao NaOCl e a maior zona de inibição foi encontrado no grupo que utilizou CHX como irrigante (Mathew et al. 2015).

Também utilizando o método de difusão em ágar contra cepas de *E. faecalis* foi possível analisar resultados satisfatórios do extrato de *Azadirachta indica* (Neem) que não apresentou diferença estatística com CHX 2% e NaOCl 5%. Ambos os grupos experimentais citados apresentaram os maiores halos de difusão, enquanto o extrato de *Curcuma longa* não demonstrou bom desempenho (Joy Sinha et al. 2017).

A fim de avaliar a atividade antimicrobiana do extrato aquoso de *P. guajava* L. como um descontaminante de escovas de dentes, foram selecionados *E. faecalis*; *S. mutans* e *Lactobacillus acidophilus*, microrganismos que estão diretamente relacionados a microbiota bucal. O objetivo do estudo em questão foi avaliar o poder do extrato em descontaminar escovas de dentes infectadas, para isso foi utilizado o extrato aquoso nas concentrações de 20% e 30% no tempo de imersão de 5 minutos e de 3 horas. Ambas as concentrações e tempos de contato foram eficazes para combater as cepas microbianas, sendo esses resultados estatisticamente semelhantes ao efeito da clorexidina 0,2% que foi utilizada como grupo controle (Vignesh et al., 2017). Portanto o extrato também pode ser utilizado como agente descontaminante para escovas de dentes.

Com o propósito de avaliar a ação antimicrobiana do extrato aquoso de sementes da planta *Moringa oleífera* (moringa), e da casca de *Solanum tuberosum* (batata) em biofilme de *E. faecalis* em um estudo piloto, os autores também utilizaram o método de difusão em ágar. Neste teste o extrato de Moringa demonstrou o melhor resultado. Entre NaOCl a 5,25% e o extrato de casca de batata não teve diferença estatística (Noushad et al. 2020).

A fim de avaliar a potencial ação antimicrobiana e antibiofilme dos extratos aquosos de própolis verde brasileira contra bactérias dentárias como *Fusobacterium nucleatum*, *Parviromonas micra*, *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis* e *Porphyromonas intermedia* o grupo de estudo utilizou para avaliação da

massa de biofilme e atividade metabólica os ensaios de cristal violeta e MTT (brometo de 3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio) . No ensaio de Cristal Violeta o extrato de própolis verde na concentração de 110mg/ml foi o mais efetivo na redução de biomassa para 37,1 ; 75,9; 73,8; 59,6; 54,0% de *F. nucleatum*, *P. micra*, *P. intermedia*, *P. gingivalis* e *P. endodontalis*, respectivamente. Sendo diferente estatisticamente do grupo salina em que não houve redução. Já a análise de viabilidade celular por MTT mostrou redução do biofilme utilizando 110 mg/mL do extrato de própolis com diferença estatística para todas os microrganismos em relação a solução salina. Porém para *P. micra* a concentração mais eficaz foi de 55 mg/mL (de Sá Assis et al. 2022).

Quatro extratos glicólicos diferentes foram avaliados por sua ação em biofilmes de espécie mista, *Pfaffia paniculata*, uma raiz originária da América do Sul, *Hamamelis virginiana* L., um arbusto originário do leste da América do Norte, *Stryphnodendron barbatiman*, uma árvore pertencente a flora brasileira, e *Gymnema sylvestre* R., uma planta do sudoeste da China e Índia. A formação do biofilme consistiu na combinação de *C. albicans* + *Streptococcus mutans*, *C. albicans* + *Staphylococcus aureus*, *C. albicans* + *E. faecalis* e *C. albicans* + *P. aeruginosa*. O tempo de contato de cada grupo com o biofilme foi de 5 minutos e 24 horas. Após contagem das UFC/mL foi possível verificar que os quatro extratos possuem ação antimicrobiana sobre biofilmes mistos no tempo de contato de 24 horas (Domingues et al. 2023).

Um estudo piloto foi realizado a fim de verificar a potencial ação antimicrobiana do extrato de *P. guajava* em bactérias planctônicas de *Enterococcus faecalis* e *C. albicans*. O ensaio revelou que o extrato foi eficaz contra uma cepa ATCC e uma clínica de *Enterococcus faecalis*, mas não demonstrou ação fungicida para nenhuma cepa de *C. albicans*, entretanto não foi avaliada a ação do extrato em biofilme (Baldoni et al. 2023).

Foi proposto em um estudo recente verificar a possível ação bactericida do extrato de *P. guajava* L. utilizando a polpa da fruta sobre cepas de *P. aeruginosa*. O estudo chegou ao resultado de Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 1000 µg/mL do extrato de *P. guajava* capaz de inibir o crescimento bacteriano de *P. aeruginosa*, o que foi relatado como fraca atividade bacteriana, já que este valor é alto quando

comparado a tobramicina (CIM 0,5 µg/MI), antibiótico que foi utilizado como controle positivo (Mahavy et al. 2024).

3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste estudo foram:

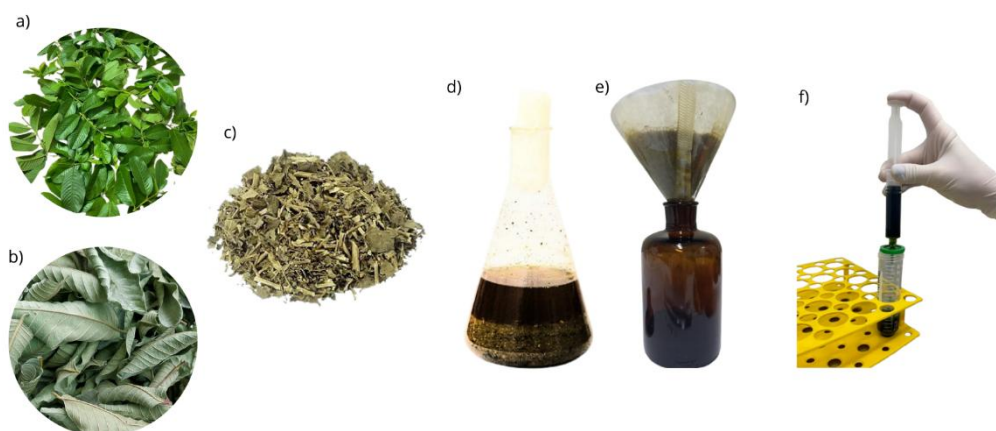
1. Produzir e avaliar fitoquimicamente o extrato hidroetanólico de *Psidium guajava* L. (goiabeira), determinando o teor de fenóis e flavonóides totais e a atividade antioxidante;
2. Avaliar ação antimicrobiana e antibiofilme do extrato de *P. guajava* L. em comparação com o hipoclorito de sódio e digluconato de clorexidina sobre cepas ATCC e clínicas de *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*, por meio de determinação da concentração inibitória mínima (CIM), concentração microbicida mínima (CMM) e viabilidade pelo teste colorimétrico de MTT pelo tempo de contato de 10 minutos;
3. Avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade do extrato de goiabeira em culturas de queratinócitos humanos (HaCaT).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Produção do extrato vegetal

O extrato hidroetanólico de *P. guajava* L. foi preparado a partir dos brotos de folhas, colhidos manualmente no mês de março de 2023 em arbustos da região sul da cidade de São José dos Campos – SP. Após colhidas foram secas no escuro entre 20-27 °C por 5 dias. O material vegetal seco foi moído em um liquidificador (Mondial, potencia 1000W) por aproximadamente 3 minutos. O veículo utilizado para extração foi etanol absoluto (álcool etílico 99.5% - Merck Darmstadt, Alemanha) e água ultrapura obtida em sistema Milli-Q® (EtOH:H₂O / 50:50), seguindo a proporção 30 g da matéria-prima para cada 100 mL do veículo, com tempo de extração de 48 h. Por fim, os extratos foram filtrados em duas etapas: filtração para remoção dos resíduos sólidos (filtro de papel com microfuros) e filtração para esterilização (filtro de membrana 0,22 µm).

Figura 1 – Etapas do processo de obtenção do extrato hidroetanólico de *P. guajava* L.



Legenda: a) Brotos de *P. guajava* L. imediatamente após colheita; b) Brotos de *P. guajava* L. secos após 5 dias; c) Brotos triturados em liquidificador; d) Brotos triturados misturados com 50% de água ultrapura e 50% de etanol absoluto; e) filtração com filtro de papel para separação da matéria orgânica; f) filtração com filtro de membrana de 0,22 µm para obter esterilidade do extrato.

Fonte: Elaborado pela autora.

4.1.1 Avaliação da composição fitoquímica por HPLC

A cromatografia líquida de alta eficiência (High-performance liquid chromatography - HPLC) foi utilizada para caracterizar o perfil do conteúdo de marcadores nos extratos e traçar o perfil fitoquímico. A análise foi realizada em um cromatógrafo líquido de alta eficiência, com um detector de fotodiodos (HPLC-DAD) e um injetor automático modelo D-7000 Merck-Hitachi (Darmstadt, Hesse, Alemanha). As condições cromatográficas foram, fase móvel: solução de ácido água-fórmico (PA, Merck) diluída na proporção de 95: 5 (solvente A) e metanol grau cromatográfico-Merck (Darmstadt, Hesse, Alemanha, solvente B). O fluxo foi de 1 mL/min e um gradiente linear começando com 0% de B, finalizando com 70% de B, em um tempo de corrida de 50 minutos. Os comprimentos de onda de detecção utilizados foram 280 e 340 nm.

4.1.2 Determinação da atividade supressora de radicais livres do extrato hidroetanólico de *P. guajava* L. (atividade antioxidante)

Foram preparadas as amostras em diferentes diluições baseadas na quantidade de sólidos solúveis determinada anteriormente. Calculou-se o volume de extrato necessário para preparar as diluições a 1% V/V e a 0,01% V/V. A alíquota calculada da solução a 1% V/V foi adicionada em um balão de 10 mL e o volume total completado com etanol. Prepara-se as diferentes diluições do extrato a 0,01% V/V. Neste momento, onze tubos de ensaio foram enumerados de 0 até 10. Adicionou-se o volume de álcool e solução do extrato (nesta ordem) em cada tubo. O tubo nº zero consistiu no controle, ou seja, 100% de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) sem extrato vegetal. Adicionou-se o volume de DPPH no 1º. tubo e acionou-se o cronômetro, desligando o mesmo após um minuto. Adicionou-se o DPPH nos outros tubos a cada um minuto, agitando os tubos periodicamente. A leitura no espectrofotômetro

(Micronal B-582, São Paulo, Brasil) em 517 nm foi iniciada após 30 minutos da adição do DPPH no 1º. tubo. Todas as leituras foram feitas em triplicatas e os valores de absorbâncias foram plotados em um gráfico Absorbância (em %) X concentração do extrato vegetal ($\mu\text{g/mL}$). Calcula-se a CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) pela planilha, pelo método dos mínimos quadrados.

4.1.3 Teor de sólidos solúveis

Foram pesados três béqueres vazios de 25 mL e os pesos anotados. Então, foram pipetados 5 mL dos extratos em cada um deles (triplicata) e em seguida, os mesmos ficaram secando em estufa a 80°C por 24 horas. Após secos, os béqueres foram colocados em dessecador até o total esfriamento e em seguida foram pesados. A quantidade de sólidos solúveis nos extratos foi quantificada a partir da fórmula abaixo:

$$\% \text{ sol. solúveis (m/v)} = (m - b) \times 100 / V_a$$

Onde: b = massa do béquer, m = massa final do extrato, após secagem, V_a = volume pipetado no Becker

Figura 2 – Etapas do processo de obtenção do teor de sólidos solúveis do extrato hidroetanólico de *P. guajava* L.



Legenda: a) Três beakers vazios foram pesados em balança de alta precisão e os pesos anotados; b) Foram pipetados 5 ml do extrato de *P. guajava* L. em cada becker; c) Os beakers foram então levados a estufa por 24 horas a 80° ; d) Após as 24 horas os beakers foram novamente pesados.

Fonte: Elaborado pela autora.

4.1.4 Determinação de flavonoides totais

Para a determinação do teor de flavonoides totais, foi preparada uma solução estoque de 100 μL do extrato em um balão volumétrico de 10 mL onde foi acrescentado metanol (álcool metílico absoluto – Êxodo científica, Sumaré, Brasil) até completar o menisco (solução estoque do extrato). O procedimento foi feito a partir deste ponto em triplicata. Retirou-se uma alíquota de 200 μL desta solução para transferir para um balão de 10 mL, já com ~ 5 mL de metanol. Adicionou-se 200 μL de cloreto de alumínio (AlCl_3) e completou-se o volume até próximo de 10 mL com metanol. A solução foi agitada e colocada no banho-maria (Generalmed, São Paulo, Brasil) por 30 minutos a 20°C . Após este tempo, acertou-se o menisco e realizou-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro em 425 nm (Micronal B-582, São Paulo, Brasil). Calculou-se a concentração de flavonoides totais expressos em quercetina, usando a equação da reta. A quercetina foi usada como padrão para quantificação.

4.1.5 Determinação do teor de fenóis totais

Em um balão volumétrico de 100 mL, 1 mL do extrato foi transferido e dissolvido com um pouco de etanol (álcool etílico 99,5% - Merck Darmstadt, Alemanha) até completar o volume com água destilada (obtida em sistema Milli-Q®) lentamente e sob agitação (solução estoque) (10 $\mu\text{g/mL}$). O procedimento foi feito a partir deste ponto em triplicata. Uma alíquota de 0,2 mL (200 μL) foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL (1:50) contendo aproximadamente 5 mL de água destilada com adição de 800 μL do reagente Folin – Ciocalteu (Sigma aldrich, Missouri, EUA). Agitou-se por alguns segundos e no intervalo de 1 a 8 minutos acrescentou-se 1,2 mL da solução de tampão carbonato-tartarato de sódio a 20%. Completou-se o volume com água até próximo ao menisco. A solução foi mantida em banho-maria (Generalmed, São Paulo, Brasil) a 20°C . Decorrido o tempo de 2 horas,

realizou-se o acerto do volume final até o menisco, agitando por alguns segundos, com a leitura a 760 nm em espectrofotômetro (Micronal B-582, São Paulo, Brasil). Determinou-se o valor de fenóis totais pela equação da reta. Uma solução estoque de fenol (padrão) foi empregado na preparação da curva padrão para posterior quantificação.

4.2 Avaliação da atividade antimicrobiana e antibiofilme

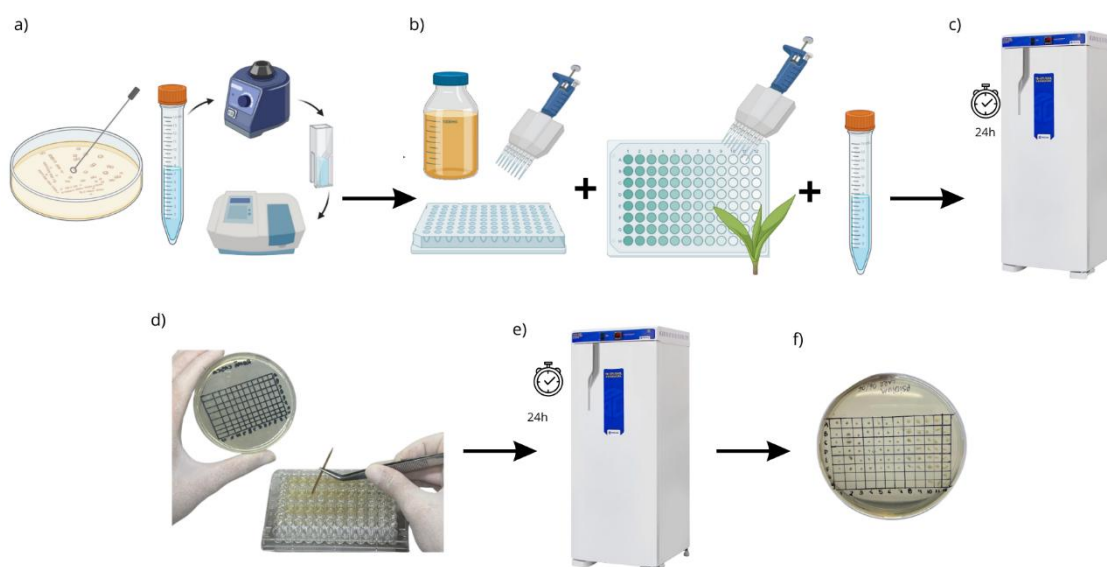
Foram utilizadas duas cepas clínicas de *Candida albicans* (cepas 14 e 60) e uma ATCC 18804. Duas cepas clínicas de *Enterococcus faecalis* (cepas 2 e 4) e uma cepa ATCC 4083. As cepas foram obtidas do laboratório de microbiologia do ICT-UNESP de São José dos Campos. *E. faecalis* foram cultivadas (37°C/24 h) em ágar BHI (Brain Heart Infusion) e as cepas fúngicas foram cultivadas (37°C/24 h) em ágar Sabouraud-dextrose (SD - Kasvi, Brasil). Em seguida, foram realizadas as preparações das suspensões microbianas em que colônias das respectivas cepas foram diluídas em solução salina estéril (NaCl 0,9%) e homogeneizado em Vortex por 10 segundos para posterior padronização da solução microbiana conforme a necessidade de cada protocolo.

4.2.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM) do extrato *Psidium guajava* L.

Foi utilizado o método de microdiluição em caldo, segundo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), norma M27-S4 e M7-A9, para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Microbicida Mínima (CMM) do extrato isolado para cada cepa fúngica e bacteriana. O inóculo foi padronizado em espectrofotômetro (Micronal B-582, São Paulo, Brasil). Para padronização de *C. albicans*, foi utilizado o comprimento de onda de 530 nm e densidade óptica de 0,284, resultando em uma suspensão padrão de 1×10^6 células

de leveduras por mililitro. Para padronização de *E. faecalis*, foi utilizado o comprimento de onda de 760 nm e densidade óptica de 0,298, resultando em uma suspensão padrão de 1×10^6 células bacterianas por mililitro. Em diferentes microplacas (Kasvi K12-096, São José do Pinhais, Brasil), foram realizadas 10 diluições seriadas (1:2) do extrato em meios de cultura: caldo RPMI 1640 (com glutamina, sem bicarbonato e com indicador vermelho de fenol) (INLAB) para o teste em *C. albicans*, e caldo Mueller Hinton (HiMedia® Mumbai, Índia) para o teste em *E. faecalis*. Alíquotas de 100 µL de cada suspensão microbiana foram adicionadas em todos os poços. Após incubação por 24 h a 37°C, a CIM foi determinada no último poço da microplaca que não apresentou turbações que indicariam crescimento microbiano. Este teste foi realizado em triplicata. Para que a Concentração Microbicida Mínima (CMM) do extrato fosse determinada, alíquotas de todos os poços foram semeados em ágar BHI e levado para incubação a 37°C por 48 h. A CMM de cada extrato para cada cepa bacteriana (clínica e padrão) foi determinada em placas sem crescimento de colônias. Um grupo tratado com o veículo (EtOH:H₂O / 50:50) foi acrescido, a fim de se verificar possível interferência na atividade antibacteriana do extrato.

Figura 3 – Etapas do processo de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM) do extrato *Psidium guajava* L.



Legenda: a) Padronização do microrganismo em espectrofotômetro; b) Na placa de cultivo celular de 96 poços primeiro é colocado meio de cultura, depois adicionado o extrato em microdiluições seriadas

e depois o microrganismo padronizado; c) A placa de 96 poços é levada para estufa microbiológica a 37° durante 24 h; d) A placa é retirada da estufa e um palito estéril é mergulhado em cada poço e perfurado o ágar no seu lugar correspondente; e) A placa de ágar é incubada novamente a 37° por 24 h; f) A placa é analisada e é considerada CMM o último poço em que não houve turvação.

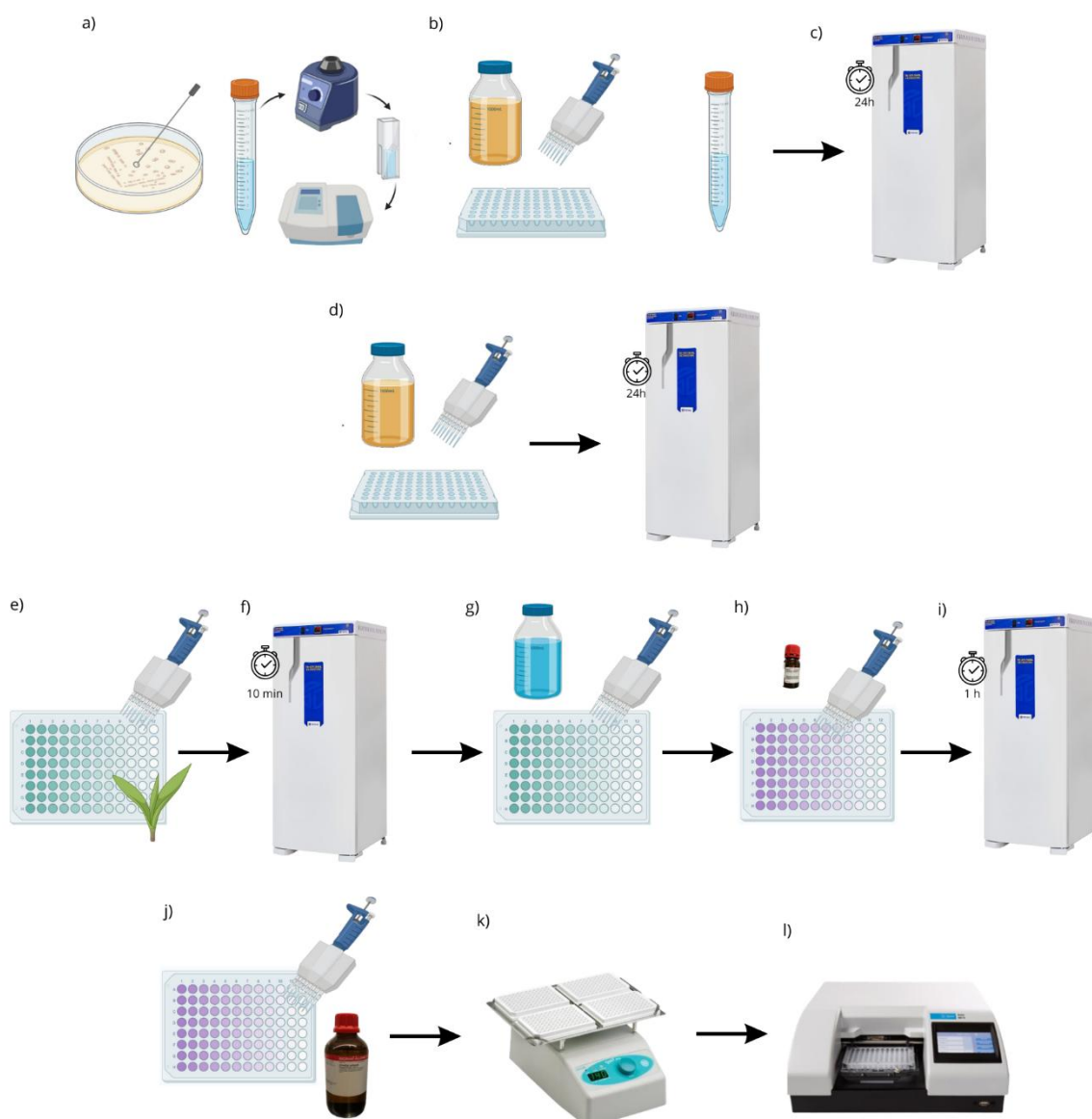
Fonte: Elaborado pela autora.

4.2.2 Avaliação da ação antibiofilme dos grupos experimentais por meio de análise de MTT

Para o estudo de biofilmes bacterianos, a análise foi baseada em Santos et al. (2020) em microplacas de 96 poços, foram acrescidos 100 µL/poço do caldo BHI (*Brain Heart Infusion* - Kasvi). Após preparo e padronização em espectrofotômetro (10^7 células/mL), a suspensão bacteriana foi adicionada nas microplacas (100 µL/poço) já contendo meio de cultura, totalizando 200 µL/poço. Para o estudo de biofilmes fúngicos, a análise foi baseada em Meccatti et al. (2023). Para tanto, foi realizada a padronização em espectrofotômetro, para obtenção de 10^7 células/mL. Posteriormente, foram adicionados em microplacas 200 µL/poço da suspensão ajustada de *Candida*, que foi levada para incubação (37°C/90 min), para a adesão inicial das células fúngicas ao poço. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e adicionado caldo BHI (*Brain Heart Infusion* - Kasvi). As placas foram levadas para incubação 37°/48h para formação do biofilme, com substituição do caldo após 24h de incubação. Depois da formação do biofilme, os mesmos foram expostos por 10 min a diferentes concentrações do extrato vegetal que foram definidas após os resultados do teste de CIM e CMM. Meio de cultura foi utilizado como controle negativo e gluconato de clorexidina 2% e hipoclorito de sódio 2,5% como controles positivo para todas as análises sobre biofilme. Cada grupo experimental foi composto por n=8. Após exposição aos grupos experimentais, foi adicionada solução salina e a mesma foi descartada, no intuito de lavar os poços e eliminar células não aderentes que sofreram com os tratamentos. Foi realizado o teste de viabilidade celular das células microbianas no qual foram adicionados 100 µL da solução de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) (Sigma-Aldrich, Brasil) em cada poço e a placa foi incubada ao abrigo da luz a 37 °C durante 1h. Passado o

período de incubação a solução de MTT foi retirada seguido pela adição de 100 μ L de Dimetilsufóxido (DMSO). A placa foi novamente incubada em estufa a 37°C por 10 minutos e colocada no Shaker sob agitação constante por 10 minutos. Em seguida foi obtida as densidades ópticas (DO) por meio de uma leitora de microplaca em 570 nm e as DO obtidas foram convertidas em percentual de atividade metabólica.

Figura 4 – Etapas do processo de avaliação da ação antibiofilme dos grupos experimentais por meio de análise de MTT



Legenda: a) Padronização do microrganismo em espectrofotômetro; b) Na placa de cultivo celular de 96 poços é colocado meio de cultura e o microrganismo padronizado; c) A placa de 96 poços é levada para estufa microbiológica a 37° durante 24 h; d) No dia seguinte o meio de cultura é trocado a fim de ter um biofilme formado de 48 horas; e) O tratamento com o extrato é aplicado; f) A placa é incubada

por 10 min; g) Cada poço é lavado duas vezes com solução salina; h) A solução de MTT é aplicada; i) A placa é incubada novamente por 1 hora ao abrigo da luz; j) A solução de MTT é retirada e é adicionado DMSO; k) a placa fica sob agitação em shaker durante 10 min; l) a placa é lida em espectrofotômetro em 570nm.

Fonte: Elaborado pela autora.

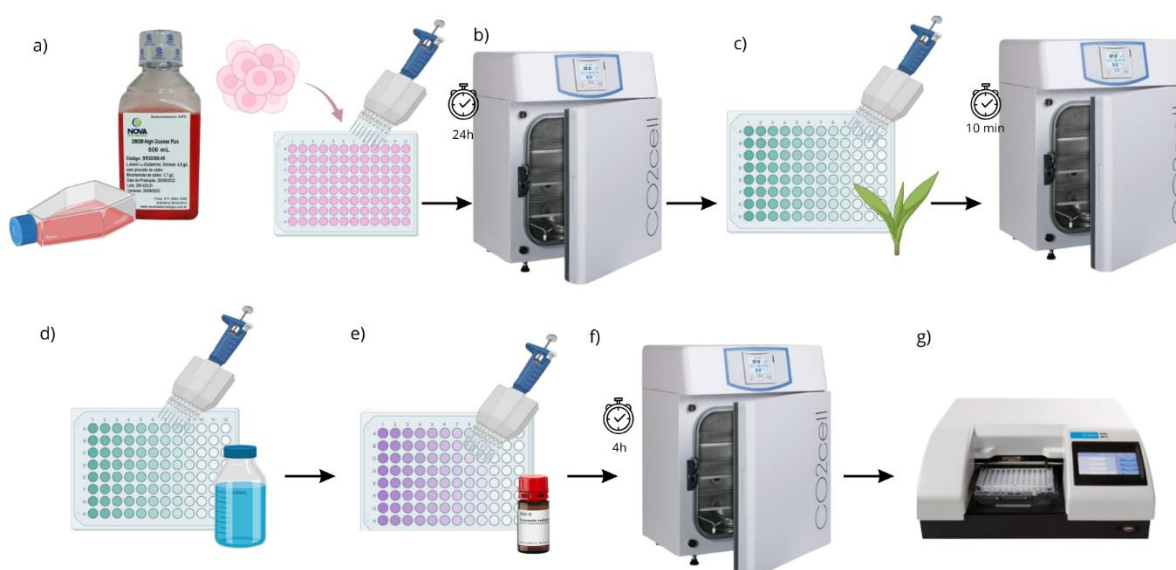
4.3 Avaliação da citotoxicidade do extrato de *P. guajava* L.

As análises da citotoxicidade e genotoxicidade do extrato *P. guajava* L. foram realizadas sobre as linhagens de queratinócitos humanos (HaCaT), provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro – Associação Técnico Científica Paul Ehrlich (APABCAM – RJ). As linhagens celulares foram cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM – LGC Biotecnologia, Cotia, Brasil), com alta concentração de glicose, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen, Nova York, EUA) e mantidas em frascos de cultivo celular (Kasvi, Brasil), incubadas em estufa à temperatura de 37°C, com umidade atmosférica e 5% de CO₂. Ao atingirem a quantidade necessária, as células foram encaminhadas aos respectivos testes.

A monocamada de células foi desagregada do assoalho do frasco de cultivo com tripsina. As culturas foram transferidas para microplacas de 96 poços (Kasvi) na concentração de 2×10^4 células viáveis e cultivadas em 200 µL de meio DMEM + 10% SFB. As placas foram incubadas (37°C, com 5% de CO₂) por 24 h para a aderência celular. Passado o período de incubação, as células foram expostas, por 10 minutos, nas diferentes concentrações do extrato que apresentaram ação antimicrobiana, com o grupo controle negativo contendo apenas a aplicação do meio DMEM e grupos controles positivos digluconato de clorexidina 2% e hipoclorito 2,5 %. As células foram submetidas ao teste de Alamar Blue, utilizando a suspensão de 5 g do pó de Resazurin sodium salt (Sigma-Aldrich, Jurubatuba, Brasil) em 500 mL de PBS para a solução mãe. A solução foi transferida para as microplacas de 96 poços no volume de 100 µL/poço, seguido pela incubação ao abrigo da luz (37°C, com 5% de CO₂) por 4 h. Posteriormente a solução foi descartada e 100 µL/poço de dimetilsulfóxido (DMSO – Sigma) foram adicionados. Após incubação de 10 min e agitação em shaker, a

absorbância dos poços foi lida em leitora de microplacas com comprimento de onda de 570 nm. As densidades ópticas (DO) obtidas foram convertidas em percentual de viabilidade celular.

Figura 5 – Etapas do processo de avaliação da citotoxicidade do extrato de *P. guajava* L.



Legenda: a) As células são plaqueadas com meio de cultura; b) A placa é incubada por 24 h; c) O extrato é colocado na placa juntamente com as células e incubado por 10 minutos; d) Cada poço é lavado duas vezes com PBS; e) É aplicada solução de resazurina; f) A placa é incubada por 4 h; g) A placa é lida em espectrofotômetro em 570 nm.

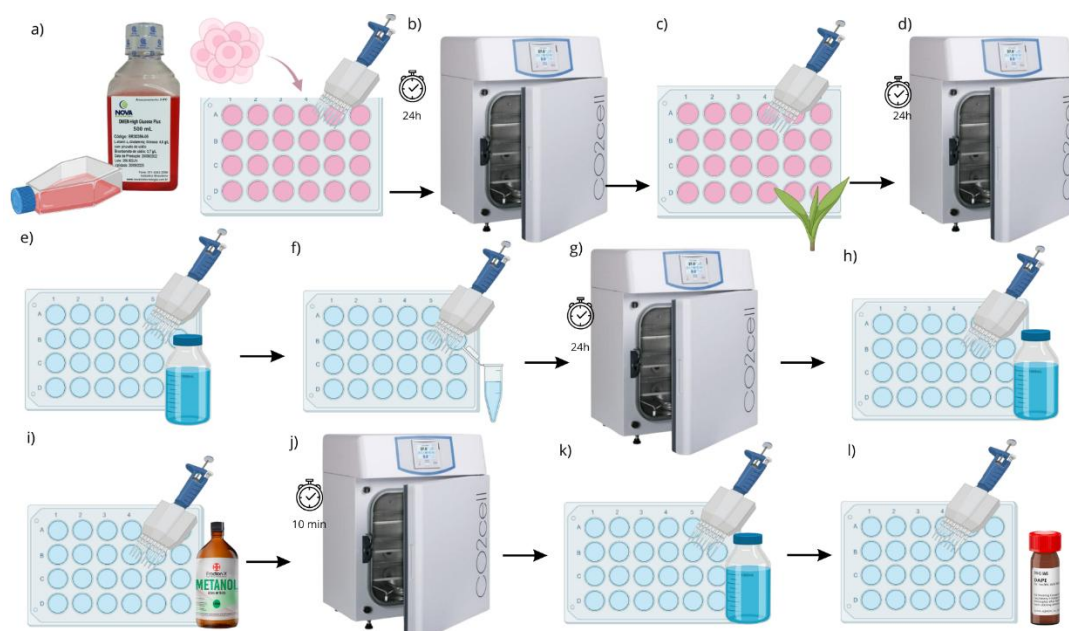
Fonte: Elaborado pela autora.

4.4 Avaliação da genotoxicidade do extrato de *P. guajava* L.

O teste de micronúcleos foi realizado de acordo com o guideline de OECD 2016 (TG 487) para linhagem de queratinócitos humanos (HaCaT). Para o teste, 5×10^5 células/mL foram cultivadas nos poços da microplaca (24 poços) por 24 h a 37°C em atmosfera de 5% CO₂. Após este período, as células foram expostas ao extrato, a clorexidina 2% e hipoclorito de sódio 2,5%, por 24h. Após, as células foram incubadas

com citocalasina B (Sigma-Aldrich) na concentração de 6 $\mu\text{g/mL}$ por 24 h a 37°C em atmosfera de 5% CO_2 para inibir a citocinese e induzir o acúmulo de células binucleadas. As células foram submetidas ao choque hipotônico e fixadas em solução de metanol: ácido acético (3:1) por 10 min (procedimento repetido 3 vezes). Os poços foram corados com a adição de 1 gota de DAPI por 5 min. Os micronúcleos foram analisados por microscopia de fluorescência (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) na objetiva de 400X, avaliando 2.000 células/poço, em pelo menos dois experimentos independentes. Os micronúcleos foram identificados como estruturas de DNA contidas no citoplasma claramente separados do núcleo principal, cercados por uma membrana nuclear e incluindo uma área menor que 1/3 da área do núcleo principal. Foram contadas as células com menos de cinco micronúcleos.

Figura 6 – Etapas do processo de avaliação da genotoxicidade do extrato de *P. guajava* L.



Legenda: a) As células são plaqueadas com meio de cultura; b) A placa é incubada por 24 h; c) O extrato é colocado na placa juntamente com as células; d) A placa é incubada por 24 h; e) Cada poço é lavado duas vezes com PBS; f) É aplicada solução de citocalasina B; g) A placa é incubada por 24 h; h) Cada poço é lavado novamente, duas vezes com PBS; i) As células são fixadas com metanol; j) É incubada por 10 min; k) Os poços são lavados mais duas vezes com PBS; l) Os poços são corados com DAPI.

Fonte: Elaborado pela autora.

4.5 Análise estatística

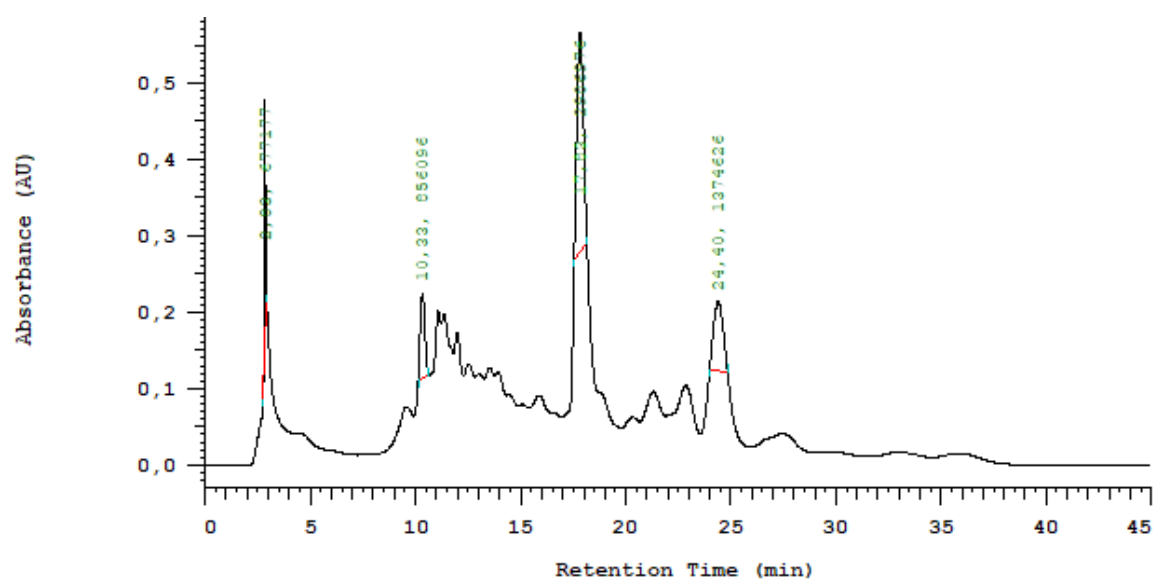
Os dados foram avaliados quanto a normalidade por meio dos testes: Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov e D'Agostino & Pearson omnibus e os que apresentaram normalidade foram analisados por ANOVA e Teste de Tukey. Para os dados não paramétricos foram utilizados os teste de Kruskal-Wallis e Teste de Dunn. Foi utilizado o programa GraphPad Prism 5.0, considerando-se nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da composição fitoquímica por HPLC

A análise cromatográfica por HPLC mostrou picos de rutina, quercetina e kaempferol no extrato de *P. guajava* L. como mostra a figura 7.

Figura 7 – Cromatograma do extrato hidroetanólico de *P. guajava* L.



Legenda: Tempo de retenção da rutina de ~10,33 min, quercitina de ~17,83 min e kaempferol de ~24,40 min.

Fonte: Elaborado pela autora.

5.1.1 Determinação da atividade supressora de radicais livres do extrato hidroetanólico de *P. guajava* L. (atividade antioxidante)

A concentração que elimina 50% dos radicais livres (CE_{50}) foi de 10,39 $\mu\text{g/mL}$ para o extrato de *P. guajava* L. com um desvio padrão de 2,90 $\mu\text{g/mL}$.

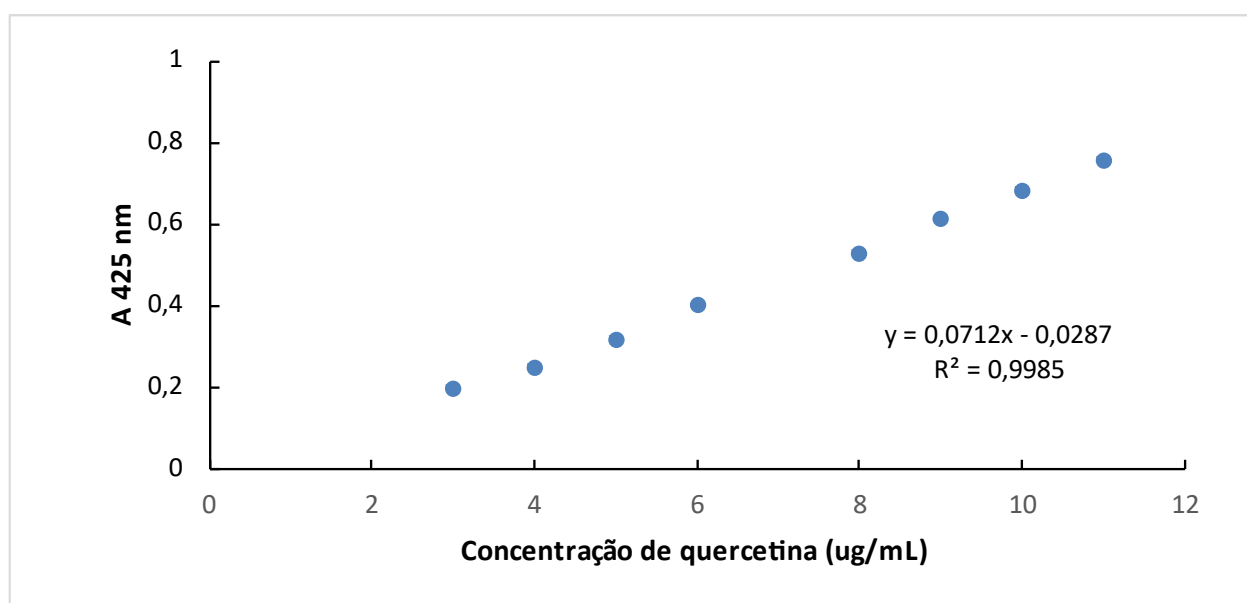
5.1.2 Teor de sólidos solúveis

A quantificação do teor de sólidos solúveis (TSS) do extrato hidroetanólico de *Psidium guajava* L. indica a quantidade de substâncias solúvel que foi extraído do extrato (EtOH:H₂O), determinando, assim, a concentração real. O resultado obtido foi de 3,35%

5.1.3 Determinação de flavonoides totais do extrato de *P. guajava* L.

Curva-padrão construída com base em diferentes concentrações de quercetina está demonstrado na figura 8.

Figura 8 – Curva-padrão de Quercetina para quantificação de flavonoides do extrato hidroetanólico de *P. guajava* L.



Legenda: Curva-padrão expressa em quercetina

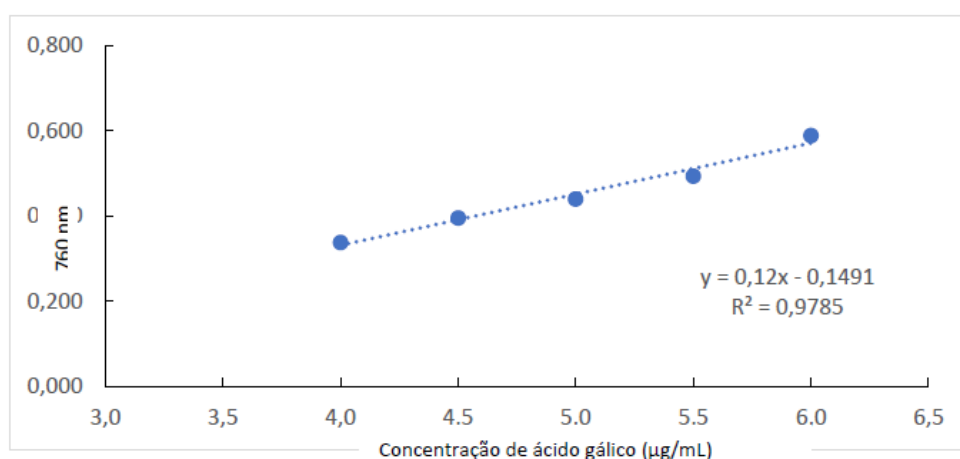
Fonte: Elaborado pela autora.

A partir da curva-padrão de quercetina, a quantidade de flavonoides totais do extrato hidroetanólico de *P. guajava* L. foi analisada, a concentração de flavonoides foi de 0,130 mg/mL, com um desvio padrão de 0,011%.

5.1.4 Determinação do teor de fenóis totais

A curva-padrão construída com base no ácido gálico está demonstrada na figura 9.

Figura 9 – Curva padrão construída com base no ácido gálico para a quantificação dos fenóis totais do extrato hidroetanólico de *P. guajava* L.



Legenda: Curva-padrão fenóis

Fonte: Elaborado pelo autora.

A partir da construção da curva-padrão dos ácidos fenóis, *P. guajava* L. foi quantificado e analisado e apresentou o teor de fenóis totais de 1,770 mg/mL (0,177%), com desvio padrão de 0,154.

5.2 Avaliação da atividade antimicrobiana e antibiofilme

5.2.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Microbicida Mínima (CMM) do extrato *Psidium guajava* L.

O extrato de *P. guajava* L. apresentou atividade bactericida e fungicida contra todas as cepas avaliadas de *E. faecalis* e *C. albicans*, os valores de CMM estão demonstrados na tabela 1, respectivamente. Não foi possível identificar os valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) devido a turbidez ocasionada pela coloração do extrato que impossibilitou a leitura visual, portanto, nesse estudo os valores de CMM foram considerados para a avaliação antibiofilme.

Tabela 1 – Concentração Microbicida Mínima (CMM) obtida pelo extrato hidroetanólico de *P. guajava* L. sobre cepas de *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*.

Cepas	CMM (mg/mL)
<i>E. faecalis</i> ATCC	1,0
<i>E. faecalis</i> 2	2,0
<i>E. faecalis</i> 4	1,0
<i>C. albicans</i> ATCC	8,3
<i>C. albicans</i> 14	2,0
<i>C. albicans</i> 60	2,0

Fonte: Elaborado pela autora.

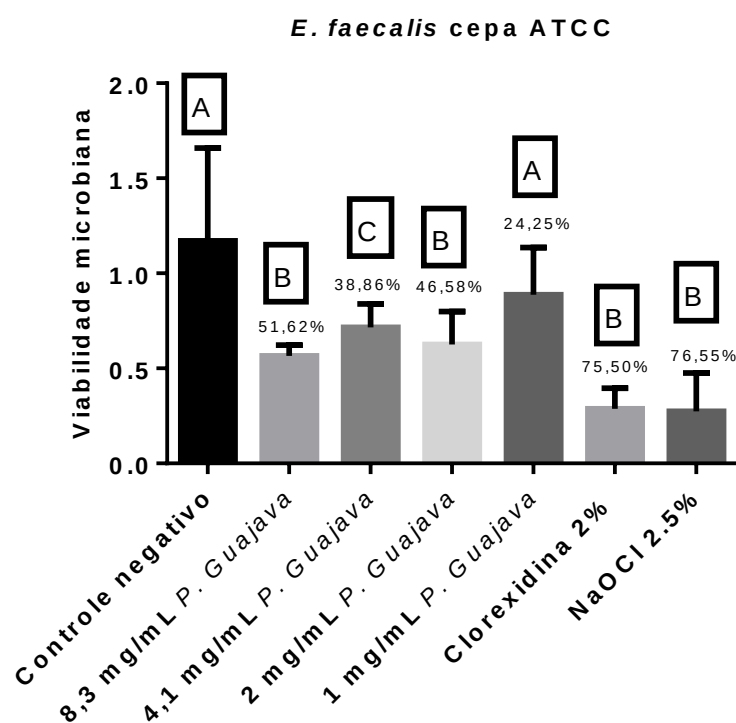
5.2.2 Avaliação da ação antibiofilme dos grupos experimentais por meio de análise de MTT

O extrato de *P. guajava* L. foi testado para avaliar se houve redução

significativa da viabilidade de biofilme após tratamento de 10 minutos, apresentando ação antibiofilme tanto para as cepas de *E. faecalis* quanto de *C. albicans*.

Para a cepa de *E. faecalis* ATCC as concentrações de 8,3 mg/mL e 2 mg/mL de *P. guajava* L. não apresentaram diferença estatística significativa em relação aos grupos de controle positivo: clorexidina 2% e NaOCl 2,5%, isto é, demonstraram redução do biofilme. A maior concentração do extrato utilizada 8,3 mg/mL reduziu 51,62% do biofilme de *E. faecalis* cepa ATCC, como mostra a figura 10.

Figura 10 – Tratamento de biofilme com extrato de *P. guajava* L. para *E. faecalis* cepa ATCC



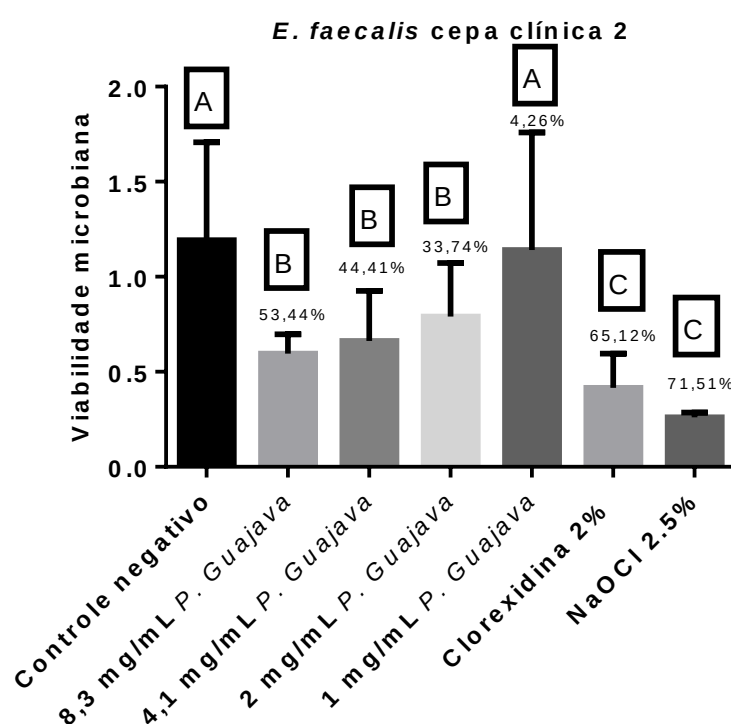
Legenda: letras (A,B,C) indicam grupos estatisticamente diferentes. Os dados de leitura de densidade ótica foram convertidos em porcentagem de viabilidade celular.

Fonte: elaborado pela autora.

Com relação a cepa clínica *E. faecalis* 2, os resultados demonstraram que todos os grupos experimentais promoveram redução significativa do biofilme em

relação ao grupo controle de crescimento, sendo estatisticamente diferente. Com exceção da menor concentração de *P. guajava* L. utilizada 1mg/mL que reduziu apenas 4,26% do biofilme. Já as concentrações mais altas promoveram reduções acima de 33,74%, o que está demonstrado na figura 11.

Figura 11 – Tratamento de biofilme com extrato de *P. guajava* L. para *E. faecalis* clínica (cepa 2)



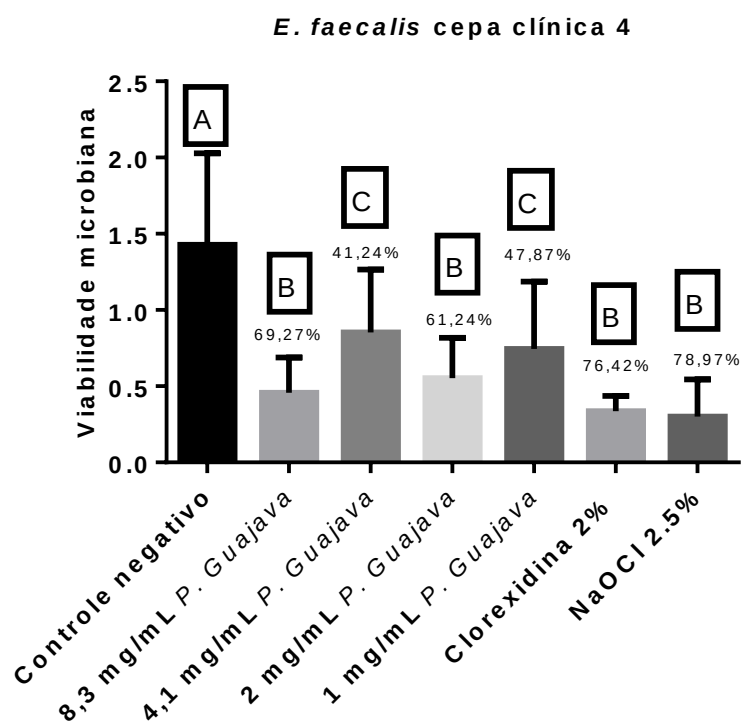
Legenda: letras (A,B,C) indicam grupos estatisticamente diferentes. Os dados de leitura de densidade ótica foram convertidos em porcentagem de viabilidade celular.

Fonte: elaborado pela autora.

Para a cepa clínica *E. faecalis* 4, as concentrações de 8,3 mg/mL e 2 mg/mL de *P. guajava* L. foram capazes de reduzir o biofilme acima de 61,24%, sendo estatisticamente semelhantes a clorexidina 2% (porcentagem de redução de 76,42%) e NaOCl 2,5% (porcentagem de redução de 78,97%). Como está demonstrado na

figura 12.

Figura 12 – Tratamento de biofilme com extrato de *P. guajava* L. para *E. faecalis* clínica (cepa 4)

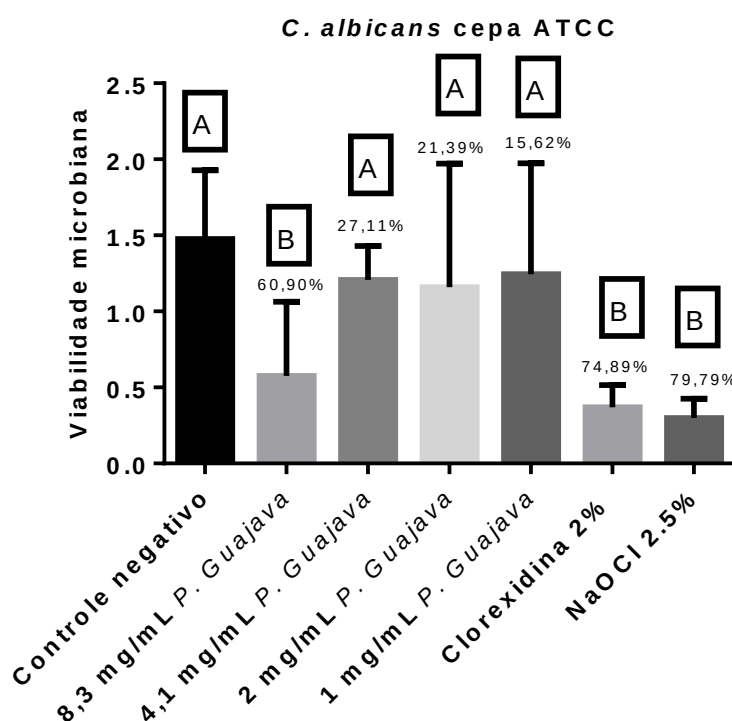


Legenda: letras (A,B,C) indicam grupos estatisticamente diferentes. Os dados de leitura de densidade ótica foram convertidos em porcentagem de viabilidade celular.

Fonte: elaborado pela autora.

Para o biofilme formado pela cepa ATCC de *C. albicans* a concentração de 8,3 mg/mL de *P. guajava* L. reduziu 60,90% do biofilme formado, não apresentando diferença estatística significativa quando comparado a clorexidina 2% e ao NaOCl 2,5% que apresentaram porcentagens de redução de 74,89% e 79,79% respectivamente. Como mostra a figura 13.

Figura 13 – Tratamento de biofilme com extrato de *P. guajava* L. para *C. albicans* ATCC



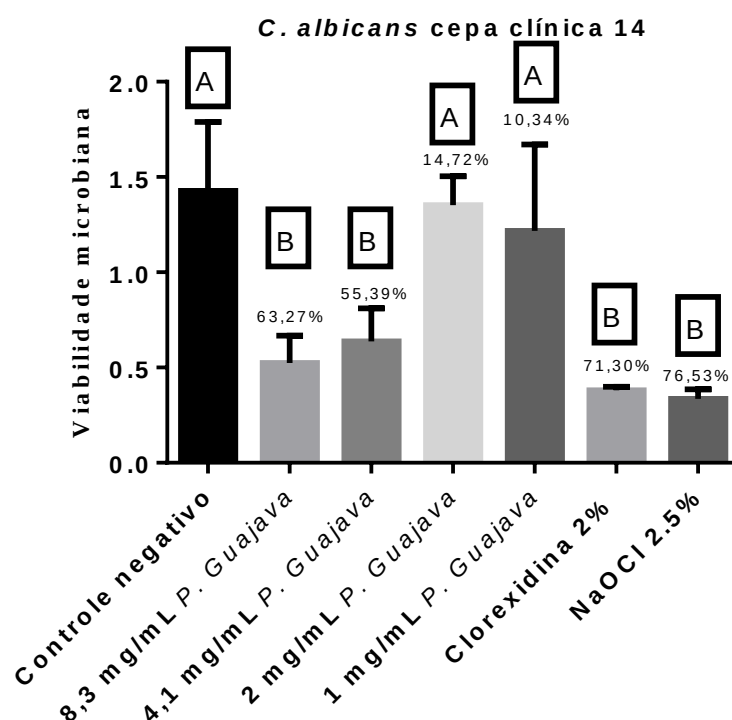
Legenda: letras (A,B) indicam grupos estatisticamente diferentes. Os dados de leitura de densidade ótica foram convertidos em porcentagem de viabilidade celular.

Fonte: elaborado pela autora.

Em relação a cepa clínica 14 de *C. albicans*, as concentrações de 8 mg/mL e 4,1 mg/mL apresentaram porcentagens de redução acima de 50%, sendo 63,27% e

55,39% respectivamente, não apresentando diferença estatística em relação a redução de biofilme com Clorexidina 2% e NaOCl 2,5%, como demonstrado na figura 14.

Figura 14 – Tratamento de biofilme com extrato de *P. guajava* L. para *C. albicans* clínica (cepa 14)

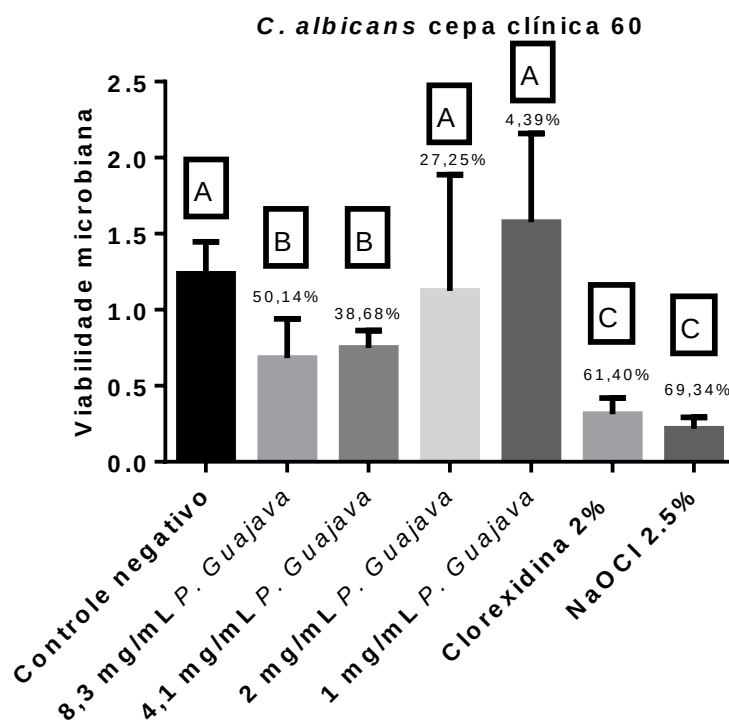


Legenda: letras (A,B) indicam grupos estatisticamente diferentes. Os dados de leitura de densidade ótica foram convertidos em porcentagem de viabilidade celular.

Fonte: elaborado pela autora.

Para a cepa clínica 60 de *C. albicans*, as concentrações de 8,3 mg/mL e 4,1 mg/mL promoveram redução significativa em relação ao controle de crescimento, embora as maiores porcentagens de redução tenham sido alcançadas pela clorexidina 2% com 61,40% de redução e NaOCl ,5% com 69,34% de redução, como mostra a figura 15.

Figura 15 – Tratamento de biofilme com extrato de *P. guajava* L. para *C. albicans* clínica (cepa 60)



Legenda: letras (A,B,C) indicam grupos estatisticamente diferentes. Os dados de leitura de densidade ótica foram convertidos em porcentagem de viabilidade celular.

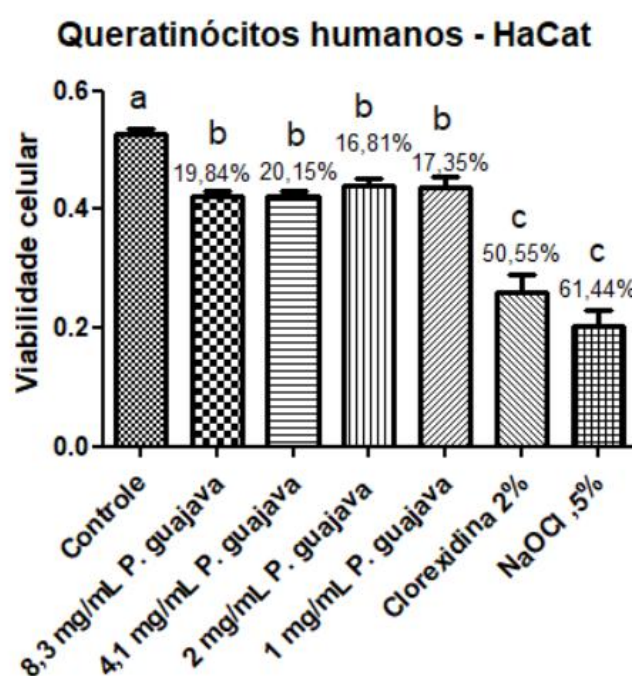
Fonte: elaborado pela autora.

5.3 Avaliação da citotoxicidade do extrato de *P. guajava* L.

Todas as concentrações testadas do extrato de *P. guajava* (8,3 mg/mL, 4,1 mg/mL, 2 mg/mL, 1mg/mL) não apresentaram toxicidade para as células de Queratinócitos humanos, porém o tratamento com CHX a 2% reduziram em 50,55% o total de células viáveis e os tratados com NaOCl 2,5% reduziram 61,44% do total de células. Os grupos CHX e NaOCl apresentaram semelhança estatística entre si, conforme demonstrado na figura 16. A figura 17 mostra as etapas de cultivo dos

queratinócitos humanos até apresentarem viabilidade para os testes laboratoriais.

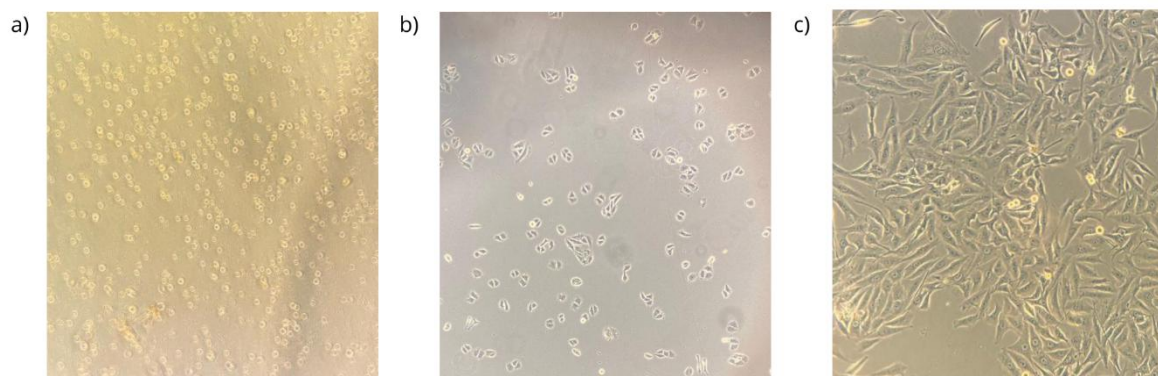
Figura 16 – Teste de viabilidade celular com cinco concentrações diferentes do extrato de *P. guajava* em Queratinócitos humanos – HaCat



Legenda: letras (A,B,C) indicam grupos estatisticamente diferentes. Os dados de leitura de densidade ótica foram convertidos em porcentagem de viabilidade celular.

Fonte: elaborado pela autora.

Figura 17 – Imagens ilustrando o cultivo dos Queratinócitos humanos – HaCat



Legenda: a) Queratinócitos humanos imediatamente após o descongelamento; b) Queratinócitos

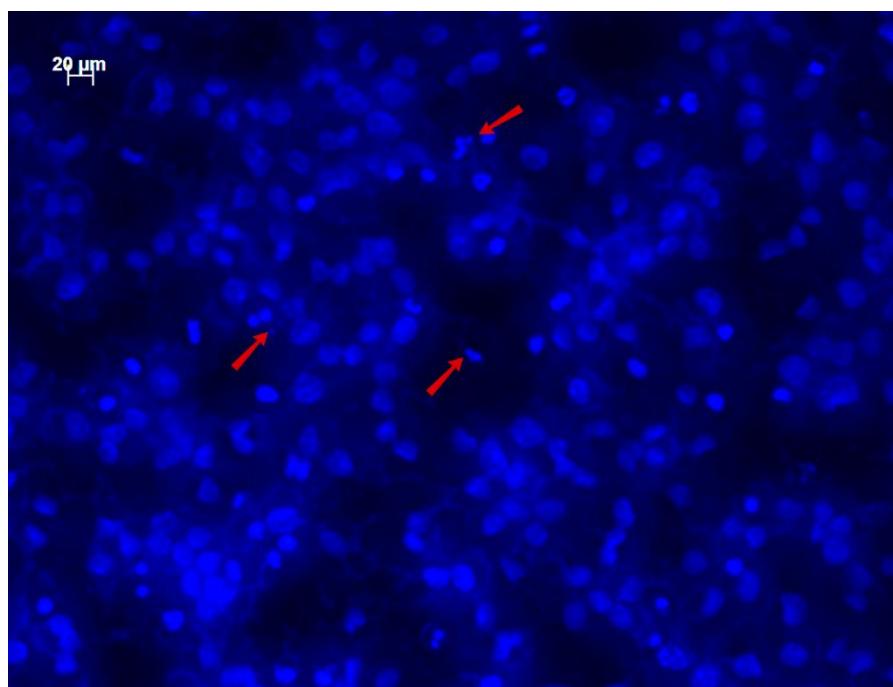
humanos iniciando a adesão na garrafa de cultivo celular; c) Queratinócitos humanos espalhados e prontos para a atividade laboratorial.

Fonte: elaborado pela autora.

5.4 Avaliação da genotoxicidade do extrato de *P. guajava* L.

A formação de micronúcleos pelas diluições mais efetivas do extrato de *P. guajava* testados foi analisada em cultura de células de queratinócitos humanos (HaCat). Os micronúcleos são identificados como estruturas contendo DNA no citoplasma. Células mononucleadas contendo menos que cinco micronúcleos foram contados, já células em mitose e as que exibiam fragmentação nuclear por apoptose não foram contadas, a imagem 18 mostra o teste de micronúcleos observado por um microscópio de fluorescência.

Figura 19 – Imagem Ilustrativa do teste de micronúcleos com Queratinócitos humanos – HaCat

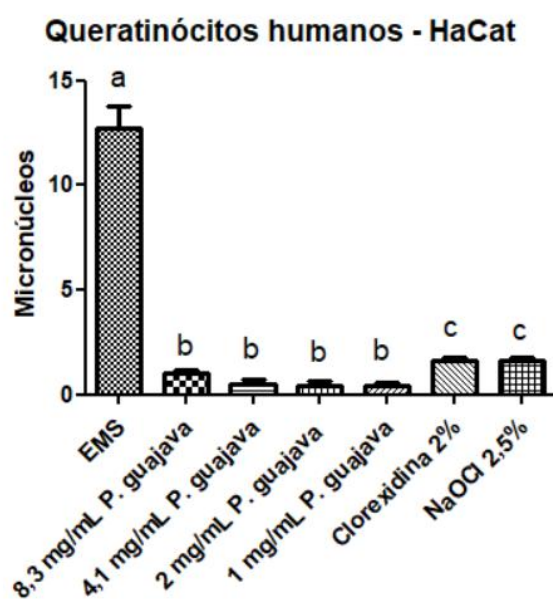


Legenda: As setas indicam os micronúcleos formados.

Fonte: elaborado pela autora.

As concentrações do extrato de *P. guajava* L. apresentaram a menor quantidade de micronúcleos, sendo estatisticamente diferentes dos grupos controles ($p < 0,05$). O EMS, utilizado como controle negativo, aumentou o número de micronúcleos em relação aos demais grupos, conforme demonstrado na figura 19.

Figura 19 – Teste de genotoxicidade com cinco concentrações diferentes do extrato de *P. guajava* em Queratinócitos humanos – HaCat



Legenda: letras (A,B,C) indicam grupos estatisticamente diferentes. Os dados de leitura de densidade ótica foram convertidos em porcentagem de viabilidade celular.

Fonte: elaborado pela autora.

6 DISCUSSÃO

Devido a busca por novas alternativas antimicrobianas eficazes contra os microrganismos relacionados a infecções endodônticas persistentes, esse estudo teve como objetivo analisar o efeito antimicrobiano do extrato de *P. guajava* L. tanto em culturas planctônicas quanto em biofilmes, bem como a ação antioxidante e citotoxicidade para que futuramente o extrato de *P. guajava* possa fazer parte de tratamentos integrativos contra infecções causadas por esses patógenos resistentes aos métodos atuais de descontaminação.

O composto fenólico quercetina, identificado neste estudo, está entre os principais componentes do extrato de *P. guajava* L. A identificação deste composto no tempo de retenção de 17,83 min está de acordo com os relatos de Díaz et al. (2016) no qual o mesmo composto foi identificado no tempo de retenção de 22,14 min (Díaz-de-Cerio et al., 2016). A identificação dos compostos fitoquímicos deste estudo feita pela cromatografia líquida de alta eficiência identificou três compostos diferentes, rutina, quercetina e kaempferol. Contudo há relatos na literatura da identificação de diversos outros compostos como vescalagina (TR: 7,71 min), catequina (TR: 9,58 min), ácido elágico (TR: 16,26 min), naringenina (TR: 26,72 min), quercetina gluconida (TR: 34,78 min), reinoutrina (TR: 37,41 min), crisoeriol (TR: 86,90 min), todos analisados a partir das folhas da goiabeira (Díaz-de-Cerio et al., 2016; Gutierrez Montiel et al., 2023; Bezerra et al., 2018).

O potencial antioxidante do extrato está diretamente relacionado à capacidade dos compostos presentes em eliminar radicais livres e a forma como os compostos foram extraídos (Selestino Neta et al., 2017). O resultado obtido da atividade antioxidante do extrato de *P. guajava* deste estudo concorda com de Souza et al., 2021 que embora tenha utilizado o óleo essencial de *P. guajava*, obteve a (CE₅₀) igual a 8,94 µg/mL valor este muito semelhante ao encontrado nesse estudo de 10,39 µg/mL mesmo utilizando métodos de extração diferentes. Outro estudo também avaliou a atividade antioxidante do extrato de *P. guajava* L. extraído com metanol e hexano, o resultado variou de acordo com o veículo utilizado para extração, a (CE₅₀)

foi de 10,33 µg/mL e 16,72 µg/mL respectivamente (Purba and Paengkoum 2022). Na literatura há relatado que o extrato hidroetanólico é mais eficiente como agente extrator, já que a quantidade de composto extraídos por esse extrato foi maior comparado aos outros tipos de veículos para extração (Moraes-Braga et al., 2017). Na literatura foi possível encontrar que a capacidade antioxidante do extrato também está relacionada ao teor de etanol utilizado na extração das folhas de goiabeira. Em um estudo, que testou três concentrações de etanol 30%, 50% e 70%, observou que quanto maior a concentração do etanol maior a sua ação antioxidante. A (CE₅₀) encontrada no extrato extraído com etanol 70% foi de 1,40 µg/mL enquanto o extrato com etanol 30% foi de 2,70 µg/mL (Park et al., 2024).

A presença do flavonoide no extrato utilizado neste estudo foi menor do que apresentado em outro trabalho na literatura, mesmo com a quantidade reduzida apresentou atividade antimicrobiana. Sabe-se que todo flavonoide é um fenol, mas nem todo fenol é um flavonoide, portanto o teor de fenóis deve sempre ser superior ao teor de flavonoides (Chaves et al., 2020). A presença de flavonoides encontrados no extrato utilizado nesse estudo foi menor do que descrito em outro estudo, enquanto na literatura foi relatado e teor de flavonoides de 1,91 mg/mL, neste estudo chegamos ao resultado de 0,130 mg/mL. Já o teor de fenóis totais também divergiu de 309,91 mg/mL para 1,170 mg/mL encontrados nesse estudo (Paiva et al., 2023). De acordo com a descoberta de Majhi et al. 2023 a presença de flavonoides como a quercetina é afetada por fatores ambientais como altitude, temperatura, umidade, solo e ph, assim conseguiram relacionar que quanto maior a altitude, maior o conteúdo de flavonoides (Majhi et al., 2023). Mesmo com quantidade reduzida de flavonoides o extrato apresentou atividade antimicrobiana.

E. faecalis foi a bactéria de escolha para este estudo porque é a bactéria mais frequentemente isolada em pós-tratamento endodôntico e possui resistência comprovada a uma grande variedade de agente antimicrobianos (Hancock et al., 2001). Neste presente estudo o extrato de *P. guajava* L. apresentou propriedade antimicrobiana e antibiofilme sobre esse microrganismo, concordando com o estudo de Dubey, 2016 que embora tenha utilizado o teste de halo de inibição, também verificou atividade antimicrobiana sobre esta cepa e comparou o NaOCl 2,5%. Outro estudo destacou a propriedade antimicrobiana do extrato etanólico de *P. guajava* L.

sobre cepa ATCC de *E. faecalis*, porém demonstraram ser necessário uma concentração de 20 mg/mL de extrato para inibir a proliferação celular das bactérias. (Elchaghaby et al., 2022). Concentração essa bem mais alta do que a encontrada neste estudo, em que a concentração microbicida mínima variou de 1 mg/mL a 2 mg/mL.

O potencial antifúngico de *P. guajava* L. também tem sido investigado na literatura consultada, esta ação antifúngica é explicada pela presença de taninos como no estudo de Mailoa et al., 2014 que comprovou o poder antimicrobiano do mesmo sobre *C. albicans* e outras bactérias como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aureginosa*, *Staphilococcus aureus*, *Aspergillus niger* sendo que a concentração do tanino está positivamente relacionada com o poder antimicrobiano do extrato. Além disso, diferentes veículos podem ser utilizados para obter o extrato de *P. guajava* L. como hexano, acetato de etila, etanol e metanol, e todos ainda mostraram poder efetivo contra diferentes cepas bacterianas e contra *C. albicans* (Jebashree et al., 2011). Estes achados se-alinham com os resultados do presente estudo que mostrou ação antibiofilme contra cepas padrão (ATCC) e clínicas de *C. albicans* em diferentes concentrações mais baixas comparado as concentrações dos estudos relatados acima, por período de 10 min. Por outro lado, os resultados do presente estudo discordam dos resultados de Baldoni et al., 2023 que não encontraram ação antifúngica para cepa ATCC e uma clínica de *C. albicans*. A concentração de 8,3 mg/mL foi efetiva contra a cepa ATCC de *C. albicans* e a concentração de 2,0 mg/mL foi suficiente para inibir o crescimento da cepa clínica de *C. albicans*

Estudos antigos relatam que há muito tempo espécies de *Candida* adquiriram resistência ao antifúngico fluconazol (Fica C. 2004; Berkow and Lockhart 2017). Assim foram feitas tentativas de maximizar o efeito desse fármaco por meio de interações sinérgicas, ao associar o fluconazol com o extrato aquoso e hidroetanólico obtido a partir das folhas de goiabeira. Foi então constatado excelente ação antifúngica, podendo concluir que o extrato de *P. guajava* L. potencializou a ação do fluconazol (Moraes-Braga et al., 2016). Este presente estudo concorda com os resultados obtidos, já que o extrato hidroetanólico de *P. guajava* também apresentou ação antifúngica sobre cepas de *C. albicans*.

O extrato de *P. guajava* também obtido a partir das folhas da goiabeira, apresentou resultado relevante ao ser utilizado em sinergia com antibióticos sobre cepas clínicas de *E. coli* resistentes, esta descoberta mostra que o extrato aumenta a eficácia dos antibióticos como tobramicina, ofloxacina e amicacina e pode se tornar um agente retardante das resistências bacterianas (Mitra et al., 2024). Assim, sugere-se o uso de *P. guajava* em associação com outros agentes antimicrobianos, ou até outros fitoterápicos, a fim de promover o poder antimicrobiano destes agentes como por exemplo os antibióticos, ou até a CHX.

Ao avaliar a citotoxicidade do extrato de *P. guajava* L. sobre culturas celulares de queratinócitos humanos, nosso estudo obteve resultados muito semelhantes ao estudo de Alves et al. 2023 que relatou ter redução celular de 20% utilizando a concentração de 1,25 µg/mL do extrato de *P. guajava* L. testado com tempo de contato de 24 horas, portanto podemos observar que o tempo de contato não altera a toxicidade sobre as células de queratinócitos humanos, visto que em nosso estudo foi utilizado o tempo de 10 minutos (Alves et al., 2023).

Em um estudo feito em modelo animal *in vivo* avaliou o efeito do extrato hidroalcoólico de *P. guajava* L. sobre ratos Wistar albino. Foram administrados 200mg/kg de peso corporal do extrato em cada rato. O objetivo era avaliar a ação protetora do extrato vegetal contra danos induzidos por radiação. Conclui-se que a dose utilizada de 200 mg/kg de peso corporal demonstrou proteção contra danos causados pela radiação, sendo o extrato um bom radioprotetor em modelo animal (Kumar et al., 2020). Esse dado contribui com o analisado neste estudo, que provou que o extrato de *P. guajava* não é citotóxico em queratinócitos humanos.

Até o momento não foram encontrados na literatura consultada artigos que avaliaram a ação genotóxica do extrato de *P. guajava* L. sobre queratinócitos humanos (HaCat). Contudo com base nos resultados obtidos nesse estudo é possível dizer que o extrato de *P. guajava* L. em diferentes concentrações não possui capacidade de formar micronúcleos, ou seja, causar alteração no material genético de queratinócitos humanos.

Além de suas boas propriedades antimicrobianas, *P. guajava* L. é uma excelente fonte de fibra alimentar, sua composição nutricional conta com altas

porcentagens de teor de vitamina C, A, E, K, potássio, fósforo, magnésio, cálcio, ferro e licopeno (este apenas em goiabas com a polpa vermelha) (Tousif et al., 2022).

Os resultados foram promissores e capazes de avançarem para futuros estudos clínicos, podendo futuramente serem utilizados no combate aos microrganismos presentes no canal radicular agindo de forma auxiliar aos métodos de descontaminação já utilizados atualmente.

7 CONCLUSÃO

Diante do exposto é possível concluir que:

1. O extrato hidroetanólico de *P. guajava* L. apresentou em sua composição fenóis e flavonóides, com ação antioxidante;
2. Possui ação antimicrobiana em cultura planctônica com concentração microbicida variando de 1 mg/mL a 2mg/mL para *E. faecalis* e 2,0 a 8,3 para *C. albicans*;
3. Possui ação antibiofilme no tempo de contato de 10 minutos na concentração de 8,3 mg/mL sobre cepas ATCC e clínicas de *E. faecalis* e *C. albicans*;
4. O extrato não apresentou citotoxicidade, nem genotoxicidade para queratinócitos humanos (HaCat).

REFERÊNCIAS

- Abu Hasna A, Pereira Santos D, Gavlik de Oliveira TR, Pinto ABA, Pucci CR, Lage-Marques JL. Apicoectomy of Perforated Root Canal Using Bioceramic Cement and Photodynamic Therapy. *Int J Dent*. 2020 Dec 9;2020:6677588. doi: 10.1155/2020/6677588. PMID: 33376491; PMCID: PMC7746471.
- Alberti A, Corbella S, Taschieri S, Francetti L, Fakhruddin KS, Samaranayake LP. Fungal species in endodontic infections: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2021 Jul 22;16(7):e0255003. doi: 10.1371/journal.pone.0255003. PMID: 34293029; PMCID: PMC8297845.
- Al-Madi EM, Almohaimede AA, Al-Obaida MI, Awaad AS. Comparison of the Antibacterial Efficacy of *Commiphora molmol* and Sodium Hypochlorite as Root Canal Irrigants against *Enterococcus faecalis* and *Fusobacterium nucleatum*. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2019 Jul 4;2019:6916795. doi: 10.1155/2019/6916795. PMID: 31354857; PMCID: PMC6637688.
- Alves MB, Vasconcelos AG, Silva de Carvalho AÉ, Slompo RC, Sá BS, Gonçalves MJL, Lima Moura LNRDC, Brito AKDS, França JVS, Martins MDCCE, Rizzo MDS, Soares S, Bastos V, Saldanha de Araujo F, Mogharbel BF, Carvalho KAT, Oliveira H, Plácido A, Arcanjo DDR, Barbosa EA, Leite JRSA. Lycopene from Red Guava (*Psidium guajava* L.): From Hepatoprotective Effect to Its Use as Promising Self-Emulsifying Drug Delivery System for Anti-Inflammatory and Antioxidant Applications. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2023 Jun 20;16(6):905. doi: 10.3390/ph16060905. PMID: 37375852; PMCID: PMC10301544.
- Andrade FB, Arias MP, Maliza AG, Duarte MA, Graeff MS, Amoroso-Silva PA, Midená RZ, Moraes IG. A new improved protocol for in vitro intratubular dentinal bacterial contamination for antimicrobial endodontic tests: standardization and validation by confocal laser scanning microscopy. *J Appl Oral Sci*. 2015 Nov-Dec;23(6):591-8. doi: 10.1590/1678-775720140261. Epub 2015 Jul 21. PMID: 26200524; PMCID: PMC4716703.
- Arévalo-Marín E, Casas A, Landrum L, Shock MP, Alvarado-Sizzo H, Ruiz-Sanchez E, Clement CR. The Taming of *Psidium guajava*: Natural and Cultural History of a Neotropical Fruit. *Front Plant Sci*. 2021 Sep 28;12:714763. doi: 10.3389/fpls.2021.714763. PMID: 34650576; PMCID: PMC8505677.
- Baldoni GA, Mecatti VM, De Carvalho LS, Carvalho CAT, Oliveira LD, Abu Hasna A. Antimicrobial action of *Psidium guajava* L. extract against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* strains: a pilot study. *Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR, [S. l.]*, v. 27, n. 7, p. 3484–3493, 2023. doi: 10.25110/arqsaude.v27i7.2023-015.
- Barbosa-Ribeiro M, Arruda-Vasconcelos R, Mendes Louzada L, Rodrigues Lima A, Marciano M, Affonso de Almeida JF, De-Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz C, Gomes BP. Microbiological Investigation in Teeth with Persistent/Secondary Endodontic

Infection in Different Stages of Root Canal Retreatment. *Eur Endod J*. 2020 Dec;5(3):219-225. doi: 10.14744/eej.2020.73626. PMID: 33353920; PMCID: PMC7881382.

Beganovic M, Luther MK, Rice LB, Arias CA, Rybak MJ, LaPlante KL. A Review of Combination Antimicrobial Therapy for *Enterococcus faecalis* Bloodstream Infections and Infective Endocarditis. *Clin Infect Dis*. 2018 Jul 2;67(2):303-309. doi: 10.1093/cid/ciy064. PMID: 29390132; PMCID: PMC6248357.

Berkow EL, Lockhart SR. Fluconazole resistance in *Candida* species: a current perspective. *Infect Drug Resist*. 2017 Jul 31;10:237-245. doi: 10.2147/IDR.S118892. PMID: 28814889; PMCID: PMC5546770.

Bezerra CF, Rocha JE, Nascimento Silva MKD, de Freitas TS, de Sousa AK, Dos Santos ATL, da Cruz RP, Ferreira MH, da Silva JCP, Machado AJT, Carneiro JNP, Sales DL, Coutinho HDM, Ribeiro PRV, de Brito ES, Morais-Braga MFB. Analysis by UPLC-MS-QTOF and antifungal activity of guava (*Psidium guajava* L.). *Food Chem Toxicol*. 2018 Sep;119:122-132. doi: 10.1016/j.fct.2018.05.021. Epub 2018 May 8. PMID: 29751075.

Bucchi C, Rosen E, Taschieri S. Non-surgical root canal treatment and retreatment versus apical surgery in treating apical periodontitis: a systematic review. *Int Endod J*. 2022 Jun 28. doi: 10.1111/iej.13793. Epub ahead of print. PMID: 35762859.

Cai C, Chen X, Li Y, Jiang Q. Advances in the Role of Sodium Hypochlorite Irrigant in Chemical Preparation of Root Canal Treatment. *Biomed Res Int*. 2023 Jan 13;2023:8858283. doi: 10.1155/2023/8858283. PMID: 36685672; PMCID: PMC9859704.

Calixto Júnior JT, Morais SM, Martins CG, Vieira LG, Morais-Braga MF, Carneiro JN, Machado AJ, Menezes IR, Tintino SR, Coutinho HD. Phytochemical analysis and modulation of antibiotic activity by *Luehea paniculata* Mart. & Zucc. (Malvaceae) in multiresistant clinical isolates of *Candida* spp. *Biomed Res Int*. 2015;2015:807670. doi: 10.1155/2015/807670. Epub 2015 Feb 22. PMID: 25821822; PMCID: PMC4363711.

Chaves JO, de Souza MC, da Silva LC, Lachos-Perez D, Torres-Mayanga PC, Machado APDF, Forster-Carneiro T, Vázquez-Espinosa M, González-de-Peredo AV, Barbero GF, Rostagno MA. Extraction of Flavonoids From Natural Sources Using Modern Techniques. *Front Chem*. 2020 Sep 25;8:507887. doi: 10.3389/fchem.2020.507887. PMID: 33102442; PMCID: PMC7546908.

Chechani B, Roat P, Hada S, Yadav DK, Kumari N. *Psidium guajava*: An Insight into Ethnomedicinal Uses, Phytochemistry, and Pharmacology. *Comb Chem High Throughput Screen*. 2024;27(1):2-39. doi: 10.2174/1386207326666230426093315. PMID: 37170987.

Csako G, Elin RJ, Hochstein HD, Tsai CM. Physical and biological properties of U.S. standard endotoxin EC after exposure to ionizing radiation. *Infect Immun*. 1983 Jul;41(1):190-6. doi: 10.1128/iai.41.1.190-196.1983. PMID: 6345389; PMCID: PMC264762.

Cvek M, Nord CE, Hollender L. Antimicrobial effect of root canal débridement in teeth with immature root. A clinical and microbiologic study. *Odontol Revy*. 1976;27(1):1-10. PMID: 1067526.

de Almeida J, Cechella BC, Bernardi AV, de Lima Pimenta A, Felipe WT. Effectiveness of nanoparticles solutions and conventional endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilm. *Indian J Dent Res*. 2018 May-Jun;29(3):347-351. doi: 10.4103/ijdr.IJDR_634_15. PMID: 29900920.

de Assis Braga DC, Carlos Batista MA, Guerra-Sá R, Alves da Silva TC, Carneiro MAA, da Silva Lanna MC, Azevedo VA, de Oliveira Carvalho RD, Souza GHB, Antunes VR, Aparecida Lima de Moura S, Ceron CS, Cardoso LM. Psidium guajava leaves extract alters colonic microbiome composition and reduces intestinal sodium absorption in rats exposed to a high-sodium diet. *J Pharm Pharmacol*. 2025 Jan 6;77(1):111-126. doi: 10.1093/jpp/rgae137. PMID: 39509435.

de Sá Assis MA, de Paula Ramos L, Abu Hasna A, de Queiroz TS, Pereira TC, Nagai de Lima PM, Berretta AA, Marcucci MC, Talge Carvalho CA, de Oliveira LD. Antimicrobial and Antibiofilm Effect of Brazilian Green Propolis Aqueous Extract against Dental Anaerobic Bacteria. *Molecules*. 2022 Nov 22;27(23):8128. doi: 10.3390/molecules27238128. PMID: 36500223; PMCID: PMC9740127.

de Souza WFC, de Lucena FA, de Castro RJS, de Oliveira CP, Quirino MR, Martins LP. Exploiting the chemical composition of essential oils from *Psidium cattleianum* and *Psidium guajava* and its antimicrobial and antioxidant properties. *J Food Sci*. 2021 Oct;86(10):4637-4649. doi: 10.1111/1750-3841.15889. Epub 2021 Sep 5. PMID: 34486118.

Domingues N, Ramos LP, Pereira LM, do Rosário Estevam Dos Santos PB, Scorzoni L, Pereira TC, Abu Hasna A, Carvalho CAT, de Oliveira LD. Antimicrobial action of four herbal plants over mixed-species biofilms of *Candida albicans* with four different microorganisms. *Aust Endod J*. 2023 Aug;49(2):262-271. doi: 10.1111/aej.12681. Epub 2022 Sep 4. PMID: 36057926.

Dubey S. Comparative antimicrobial efficacy of herbal alternatives (*Emblica officinalis*, *Psidium guajava*), MTAD, and 2.5% sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis*: An in vitro study. *J Oral Biol Craniofac Res*. 2016 Jan-Apr;6(1):45-8. doi: 10.1016/j.jobcr.2015.12.010. Epub 2016 Jan 20. PMID: 26937369; PMCID: PMC4756078.

Elchaghaby MA, Abd El-Kader SF, Aly MM. Bioactive composition and antibacterial activity of three herbal extracts (lemongrass, sage, and guava leaf) against oral bacteria: An in vitro study. *J Oral Biosci*. 2022 Mar;64(1):114-119. doi: 10.1016/j.job.2022.01.005. Epub 2022 Jan 25. PMID: 35091066.

Elixabet Díaz-de-Cerio, Ana María Gómez-Caravaca, Vito Verardo, Alberto Fernández-Gutiérrez, Antonio Segura-Carretero. Determination of guava (*Psidium*

guajava L.) leaf phenolic compounds using HPLC-DAD-QTOF-MS, Journal of Functional Foods, Volume 22, 2016, Pages 376-388, ISSN 1756-4646, <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.01.040>.

Endo MS, Ferraz CCR, Zaia AA, Almeida JFA, Gomes BPFA. Quantitative and qualitative analysis of microorganisms in root-filled teeth with persistent infection: Monitoring of the endodontic retreatment. Eur J Dent. 2013 Jul;7(3):302-309. doi: 10.4103/1305-7456.115414. PMID: 24926210; PMCID: PMC4053619.

Essner MD, Javed A, Eleazer PD. Effect of sodium hypochlorite on human pulp cells: an in vitro study. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2011 Nov;112(5):662-6. doi: 10.1016/j.tripleo.2011.04.030. Epub 2011 Aug 6. PMID: 21821446; PMCID: PMC4263027.

Ferreira RB, Marchesan MA, Silva-Sousa YT, Sousa-Neto M. Effectiveness of root canal debris removal using passive ultrasound irrigation with chlorhexidine digluconate or sodium hypochlorite individually or in combination as irrigants. J Contemp Dent Pract. 2008 Jul 1;9(5):68-75. PMID: 18633471.

Fica C., Alberto. Tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas Primera parte: fluconazol, itraconazol y voriconazol. Rev. chil. infectol., Santiago, v. 21, n. 1, p. 26-38, 2004. Disponible en <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182004000100004&lng=es&nrm=iso>. accedido en 17 dic. 2024. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182004000100004>.

Graciani J, Rosalen PL, de Oliveira Chaves Dos Santos E, et al. Evaluation of efficacy of new chalcone-based endodontic irrigant against dual biofilm *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*: a study in vitro. Odontology. 2023 Jul;111(3):573-579. DOI: 10.1007/s10266-022-00764-y. PMID: 36414881.

Gutierrez-Montiel D, Guerrero-Barrera AL, Chávez-Vela NA, Avelar-Gonzalez FJ, Ornelas-García IG. *Psidium guajava* L.: From byproduct and use in traditional Mexican medicine to antimicrobial agent. Front Nutr. 2023 Jan 24;10:1108306. doi: 10.3389/fnut.2023.1108306. PMID: 36761221; PMCID: PMC9902774.

Gutierrez Montiel D, Guerrero Barrera AL, Martínez Ávila GCG, Gonzalez Hernandez MD, Chavez Vela NA, Avelar Gonzalez FJ, Ramírez Castillo FY. Influence of the Extraction Method on the Polyphenolic Profile and the Antioxidant Activity of *Psidium guajava* L. Leaf Extracts. Molecules. 2023 Dec 22;29(1):85. doi: 10.3390/molecules29010085. PMID: 38202668; PMCID: PMC10779645.

Hancock HH 3rd, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2001 May;91(5):579-86. doi: 10.1067/moe.2001.113587. PMID: 11346739.

Jebashree HS, Kingsley SJ, Sathish ES, Devapriya D. Antimicrobial Activity of Few Medicinal Plants against Clinically Isolated Human Cariogenic Pathogens-An In Vitro Study. ISRN Dent. 2011;2011:541421. doi: 10.5402/2011/541421. Epub 2011 Jun 8. PMID: 21991479; PMCID: PMC3169913.

Jeong JW, Sarmast ND, Terlier T, van der Hoeven R, Holland JN, Parikh N. Assessment of the cytotoxic effects and chemical composition of the insoluble precipitate formed from sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate. *Int Endod J*. 2021 Oct;54(10):1892-1901. doi: 10.1111/iej.13583. Epub 2021 Jul 1. PMID: 34081782.

Joy Sinha D, D S Nandha K, Jaiswal N, Vasudeva A, Prabha Tyagi S, Pratap Singh U. Antibacterial Effect of *Azadirachta indica* (Neem) or *Curcuma longa* (Turmeric) against *Enterococcus faecalis* Compared with That of 5% Sodium Hypochlorite or 2% Chlorhexidine in vitro. *Bull Tokyo Dent Coll*. 2017;58(2):103-109. doi: 10.2209/tdcpublication.2015-0029. PMID: 28724858.

Karaoğlu F, Miçoğlu Kurt S, Çalışkan MK. Outcome of single- versus two-visit root canal retreatment in teeth with periapical lesions: A randomized clinical trial. *Int Endod J*. 2022 Aug;55(8):833-843. doi: 10.1111/iej.13758. Epub 2022 May 17. PMID: 35488883.

Kayaoglu G, Ömürlü H, Akca G, Gürel M, Gençay Ö, Sorkun K, Salih B. Antibacterial activity of Propolis versus conventional endodontic disinfectants against *Enterococcus faecalis* in infected dentinal tubules. *J Endod*. 2011 Mar;37(3):376-81. doi: 10.1016/j.joen.2010.11.024. Epub 2011 Jan 8. PMID: 21329825.

Koskinen KP, Stenvall H, Uitto VJ. Dissolution of bovine pulp tissue by endodontic solutions. *Scand J Dent Res*. 1980 Oct;88(5):406-11. doi: 10.1111/j.1600-0722.1980.tb01246.x. PMID: 6258220.

Kumar A, Kumarchandra R, Rai R, Kumblekar V. Radiation mitigating activities of *Psidium guajava* L. against whole-body X-ray-induced damages in albino Wistar rat model. *3 Biotech*. 2020 Dec;10(12):507. doi: 10.1007/s13205-020-02484-y. Epub 2020 Nov 4. PMID: 33178550; PMCID: PMC7642191.

Kuruvilla JR, Kamath MP. Antimicrobial activity of 2.5% sodium hypochlorite and 0.2% chlorhexidine gluconate separately and combined, as endodontic irrigants. *J Endod*. 1998 Jul;24(7):472-6. doi: 10.1016/S0099-2399(98)80049-6. PMID: 9693573.

Liu H, Nio S, Shen Y. Sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis* biofilm in dentinal tubules: effect of concentration, temperature, and exposure time. *Odontology*. 2024 Apr;112(2):390-398. doi: 10.1007/s10266-023-00850-9. Epub 2023 Aug 30. PMID: 37646916.

Ma J, Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. A new noninvasive model to study the effectiveness of dentin disinfection by using confocal laser scanning microscopy. *J Endod*. 2011 Oct;37(10):1380-5. doi: 10.1016/j.joen.2011.06.018. Epub 2011 Jul 30. PMID: 21924186.

Machado FP, Khoury RD, Toia CC, Flores Orozco EI, de Oliveira FE, de Oliveira LD, da Rosa Cardoso FG, Valera MC. Primary versus post-treatment apical periodontitis: microbial composition, lipopolysaccharides and lipoteichoic acid levels, signs and symptoms. *Clin Oral Investig*. 2020 Sep;24(9):3169-3179. doi: 10.1007/s00784-019-03191-6. Epub 2020 Jan 13. PMID: 31933111.

Mahavy CE, Razanatseheho AJ, Mol A, Ngezahayo J, Duez P, El Jaziri M, Baucher M, Rasamiravaka T. Edible Medicinal Guava Fruit (*Psidium guajava* L.) Are a Source of Anti-Biofilm Compounds against *Pseudomonas aeruginosa*. *Plants (Basel)*. 2024 Apr 17;13(8):1122. doi: 10.3390/plants13081122. PMID: 38674531; PMCID: PMC11054768.

Mailoa Meigh Nelce, Mahendradatta, Laga Amran, Djide Natsir. Antimicrobial Activities Of Tannins Extract From Guava Leaves (*Psidium Guajava* L) On Pathogens Microbial. *International Journal of Scientific & Technology Research*. 2014 Jan; 1(3):236-241.

Majhi R, Maharjan R, Shrestha M, Mali A, Basnet A, Baral M, Duwal R, Manandhar R, Rajbhandari P. Effect of altitude and solvent on *Psidium guajava* Linn. leaves extracts: phytochemical analysis, antioxidant, cytotoxicity and antimicrobial activity against food spoilage microbes. *BMC Chem*. 2023 Apr 13;17(1):36. doi: 10.1186/s13065-023-00948-9. PMID: 37055840; PMCID: PMC10100324.

Mathew J, Pathrose S, Kottoor J, Karaththodiyil R, Alani M, Mathew J. Evaluation of an Indigenously Prepared Herbal Extract (EndoPam) as an Antimicrobial Endodontic Irrigant: An Ex Vivo Study. *J Int Oral Health*. 2015 Jun;7(6):88-91. PMID: 26124607; PMCID: PMC4479781.

Meccatti VM, Santos LF, de Carvalho LS, Souza CB, Carvalho CAT, Marcucci MC, Abu Hasna A, de Oliveira LD. Antifungal Action of Herbal Plants' Glycolic Extracts against *Candida* Species. *Molecules*. 2023 Mar 22;28(6):2857. doi: 10.3390/molecules28062857. PMID: 36985829; PMCID: PMC10054556.

Mergoni G, Percudani D, Lodi G, Bertani P, Manfredi M. Prevalence of *Candida* Species in endodontic infections: systematic review and meta-analysis. *J Endod*. 2018 Nov;44(11):1616-1625.e9. doi: 10.1016/j.joen.2018.07.016. Epub 2018 Sep 18. PMID: 30241680.

Mitra S, Bhesania Hodiwala AV, Kar H. Susceptibility and Synergistic Effects of Guava Plant Extract and Antimicrobial Drugs on *Escherichia coli*. *Cureus*. 2024 Jan 15;16(1):e52345. doi: 10.7759/cureus.52345. PMID: 38361731; PMCID: PMC10867551.

Morais-Braga MFB, Sales DL, Carneiro JNP, Machado AJT, Dos Santos ATL, de Freitas MA, Martins GMAB, Leite NF, de Matos YMLS, Tintino SR, Souza DSL, Menezes IRA, Ribeiro-Filho J, Costa JGM, Coutinho HDM. *Psidium guajava* L. and *Psidium brownianum* Mart ex DC.: Chemical composition and anti - *Candida* effect in association with fluconazole. *Microb Pathog*. 2016 Jun;95:200-207. doi: 10.1016/j.micpath.2016.04.013. Epub 2016 Apr 13. PMID: 27085299.

Morais-Braga MF, Carneiro JN, Machado AJ, Sales DL, Dos Santos AT, Boligon AA, Athayde ML, Menezes IR, Souza DS, Costa JG, Coutinho HD. Phenolic composition and medicinal usage of *Psidium guajava* Linn.: Antifungal activity or inhibition of virulence? *Saudi J Biol Sci*. 2017 Feb;24(2):302-313. doi:

10.1016/j.sjbs.2015.09.028. Epub 2015 Sep 30. PMID: 28149166; PMCID: PMC5272930.

Narayanan LL, Vaishnavi C. Endodontic microbiology. J Conserv Dent. 2010 Oct;13(4):233-9. doi: 10.4103/0972-0707.73386. PMID: 21217951; PMCID: PMC3010028.

Ng YL, Mann V, Gulabivala K. A prospective study of the factors affecting outcomes of nonsurgical root canal treatment: part 1: periapical health. Int Endod J. 2011 Jul;44(7):583-609. doi: 10.1111/j.1365-2591.2011.01872.x. Epub 2011 Mar 2. PMID: 21366626.

Noushad MC, Ashraf K, Suneetha MP. Antibacterial Efficacy of Muringa Seed Extract and Potato Peel Extract Against *Enterococcus faecalis*. Contemp Clin Dent. 2020 Oct-Dec;11(4):327-331. doi: 10.4103/ccd.ccd_223_19. Epub 2020 Dec 20. PMID: 33850397; PMCID: PMC8035844.

Orstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. Endod Dent Traumatol. 1990 Aug;6(4):142-9. doi: 10.1111/j.1600-9657.1990.tb00409.x. PMID: 2133305.

Paiva YF, Figueirêdo RMF, Queiroz AJM, Amadeu LTS, Santos FSD, Reis CGD, Carvalho AJBA, Lima MDS, Lima AGB, Gomes JP, Moura RL, Moura HV, Silva ETV. Physicochemical Aspects, Bioactive Compounds, Phenolic Profile and In Vitro Antioxidant Activity of Tropical Red Fruits and Their Blend. Molecules. 2023 Jun 20;28(12):4866. doi: 10.3390/molecules28124866. PMID: 37375421; PMCID: PMC10302636.

Park H, Kim B, Kang Y, Kim W. Study on Chemical Composition and Biological Activity of *Psidium guajava* Leaf Extracts. Curr Issues Mol Biol. 2024 Mar 6;46(3):2133-2143. doi: 10.3390/cimb46030137. PMID: 38534753; PMCID: PMC10969706.

Parolia A, Kumar H, Ramamurthy S, Madheswaran T, Davamani F, Pichika MR, Mak KK, Fawzy AS, Daood U, Pau A. Effect of Propolis Nanoparticles against *Enterococcus faecalis* Biofilm in the Root Canal. Molecules. 2021 Jan 30;26(3):715. doi: 10.3390/molecules26030715. PMID: 33573147; PMCID: PMC7866495.

Pereira RS, Rodrigues VAA, Furtado WT, Gueiros S, Pereira GS, Avila-Campos MJ. Microbial analysis of root canal and periradicular lesion associated to teeth with endodontic failure. Anaerobe. 2017 Dec;48:12-18. doi: 10.1016/j.anaerobe.2017.06.016. Epub 2017 Jun 27. PMID: 28666877.

Pourhajibagher M, Ghorbanzadeh R, Bahador A. Culture-dependent approaches to explore the prevalence of root canal pathogens from endodontic infections. Braz Oral Res. 2017 Dec 18;31:e108. doi: 10.1590/1807-3107bor-2017.vol31.0108. PMID: 29267669.

Prabhakar J, Senthilkumar M, Priya MS, Mahalakshmi K, Sehgal PK, Sukumaran VG. Evaluation of antimicrobial efficacy of herbal alternatives (Triphala and green tea polyphenols), MTAD, and 5% sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis* biofilm formed on tooth substrate: an in vitro study. *J Endod*. 2010 Jan;36(1):83-6. doi: 10.1016/j.joen.2009.09.040. PMID: 20003940.

Prada I, Micó-Muñoz P, Giner-Lluesma T, Micó-Martínez P, Collado-Castellano N, Manzano-Saiz A. Influence of microbiology on endodontic failure. Literature review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2019 May 1;24(3):e364-e372. doi: 10.4317/medoral.22907. PMID: 31041915; PMCID: PMC6530959.

Purba RAP, Paengkoum P. Farang (*Psidium guajava* L.) Dried Leaf Extracts: Phytochemical Profiles, Antioxidant, Anti-Diabetic, and Anti-Hemolytic Properties for Ruminant Health and Production. *Molecules*. 2022 Dec 16;27(24):8987. doi: 10.3390/molecules27248987. PMID: 36558117; PMCID: PMC9781826.

Radcliffe CE, Potouridou L, Qureshi R, Hababbeh N, Qualtrough A, Worthington H, Drucker DB. Antimicrobial activity of varying concentrations of sodium hypochlorite on the endodontic microorganisms *Actinomyces israelii*, *A. naeslundii*, *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J*. 2004 Jul;37(7):438-46. doi: 10.1111/j.1365-2591.2004.00752.x. PMID: 15189432.

Rosaline H, Kandaswamy D, Gogulnath D, Rubin M. Influence of various herbal irrigants as a final rinse on the adherence of *Enterococcus faecalis* by fluorescence confocal laser scanning microscope. *J Conserv Dent*. 2013 Jul;16(4):352-5. doi: 10.4103/0972-0707.114365. PMID: 23956540; PMCID: PMC3740649.

Salehrabi R, Rotstein I. Epidemiologic evaluation of the outcomes of orthograde endodontic retreatment. *J Endod*. 2010 May;36(5):790-2. doi: 10.1016/j.joen.2010.02.009. Epub 2010 Mar 24. PMID: 20416420.

Sarda RA, Shetty RM, Tamrakar A, Shetty SY. Antimicrobial efficacy of photodynamic therapy, diode laser, and sodium hypochlorite and their combinations on endodontic pathogens. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2019 Dec;28:265-272. doi: 10.1016/j.pdpdt.2019.09.009. Epub 2019 Oct 1. PMID: 31585175.

Schilder H. Cleaning and shaping the root canal. *Dent Clin North Am*. 1974 Apr;18(2):269-96. PMID: 4522570.

Selestino Neta MC, Vittorazzi C, Guimarães AC, Martins JD, Fronza M, Endringer DC, Scherer R. Effects of β -caryophyllene and *Murraya paniculata* essential oil in the murine hepatoma cells and in the bacteria and fungi 24-h time-kill curve studies. *Pharm Biol*. 2017 Dec;55(1):190-197. doi: 10.1080/13880209.2016.1254251. PMID: 27927082; PMCID: PMC6130565.

Shadmehr E, Davoudi A, Damoon Sarmast N, Saatchi M. Evaluation of Antimicrobial Efficacy of Calcium Hypochlorite as an Endodontic Irrigant on a Mixed-Culture Biofilm: An *Ex vivo* Study. *Iran Endod J*. 2019 Summer;14(3):178-184. doi: 10.22037/iej.v14i3.22451. PMID: 36814951; PMCID: PMC9940026.

Siqueira JF Jr, Rôças IN, Favieri A, Lima KC. Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2.5%, and 5.25% sodium hypochlorite. *J Endod*. 2000 Jun;26(6):331-4. doi: 10.1097/00004770-200006000-00006. PMID: 11199749.

Siqueira JF Jr, Rôças IN, Lopes HP, Elias CN, de Uzeda M. Fungal infection of the radicular dentin. *J Endod*. 2002 Nov;28(11):770-3. doi: 10.1097/00004770-200211000-00006. PMID: 12470022.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. Present status and future directions: Microbiology of endodontic infections. *Int Endod J*. 2022 May;55 Suppl 3:512-530. doi: 10.1111/iej.13677. Epub 2022 Jan 13. PMID: 34958494.

Tousif MI, Nazir M, Saleem M, Tauseef S, Shafiq N, Hassan L, Hussian H, Montesano D, Naviglio D, Zengin G, Ahmad I. *Psidium guajava* L. An Incalculable but Underexplored Food Crop: Its Phytochemistry, Ethnopharmacology, and Industrial Applications. *Molecules*. 2022 Oct 18;27(20):7016. doi: 10.3390/molecules27207016. PMID: 36296606; PMCID: PMC9611817.

Tyagi SP, Sinha DJ, Garg P, Singh UP, Mishra CC, Nagpal R. Comparison of antimicrobial efficacy of propolis, *Morinda citrifolia*, *Azadirachta indica* (Neem) and 5% sodium hypochlorite on *Candida albicans* biofilm formed on tooth substrate: An in-vitro study. *J Conserv Dent*. 2013 Nov;16(6):532-5. doi: 10.4103/0972-0707.120973. PMID: 24347888; PMCID: PMC3842722.

Valera MC, da Rosa JA, Maekawa LE, de Oliveira LD, Carvalho CA, Koga-Ito CY, Jorge AO. Action of propolis and medications against *Escherichia coli* and endotoxin in root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010 Oct;110(4):e70-4. doi: 10.1016/j.tripleo.2010.01.029. PMID: 20868987.

Vianna ME, Gomes BP. Efficacy of sodium hypochlorite combined with chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009 Apr;107(4):585-9. doi: 10.1016/j.tripleo.2008.10.023. Epub 2009 Jan 20. PMID: 19157916.

Vignesh R, Rekha CV, Baghkomeh PN, Annamalai S, Sharmin D. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of an alternative natural agent for disinfection of toothbrushes. *Eur J Dent*. 2017 Jan-Mar;11(1):111-116. doi: 10.4103/ejd.ejd_196_16. PMID: 28435376; PMCID: PMC5379822.

Vivekananda Pai AR. Factors influencing the occurrence and progress of sodium hypochlorite accident: A narrative and update review. *J Conserv Dent*. 2023 Jan-Feb;26(1):3-11. doi: 10.4103/jcd.jcd_422_22. Epub 2022 Dec 8. PMID: 36908722; PMCID: PMC10003279.

Waltimo TMT, Haapasalo M, Zehnder M, Meyer J. Clinical aspects related to endodontic yeast infections. *Endod Topics*. 2004 Nov;9(1):66-78. doi: 10.1111/j.1601-1546.2004.00086.x

Yadav J, Das S, Karthikeyan D, Chug R, Jyoti A, Srivastava VK, Jain A, Kumar S, Sharma V, Kaushik S. Identification of Protein Drug Targets of Biofilm Formation and Quorum Sensing in Multidrug Resistant *Enterococcus faecalis*. *Curr Protein Pept Sci*. 2022;23(4):248-263. doi: 10.2174/1389203723666220526155644. PMID: 35619261.

Ye WH, Fan B, Purcell W, Meghil MM, Cutler CW, Bergeron BE, Ma JZ, Tay FR, Niu LN. Anti-biofilm efficacy of root canal irrigants against in-situ *Enterococcus faecalis* biofilms in root canals, isthmuses and dentinal tubules. *J Dent*. 2018 Dec;79:68-76. doi: 10.1016/j.jdent.2018.10.002. Epub 2018 Oct 5. PMID: 30296552.

Yoo YJ, Kwon I, Oh SR, Perinpanayagam H, Lim SM, Ahn KB, Lee Y, Han SH, Chang SW, Baek SH, Zhu Q, Kum KY. Antifungal Effects of Synthetic Human Beta-defensin-3-C15 Peptide on *Candida albicans*-infected Root Dentin. *J Endod*. 2017 Nov;43(11):1857-1861. doi: 10.1016/j.joen.2017.06.035. Epub 2017 Sep 23. PMID: 28951032.

Yoo YJ, Kim AR, Perinpanayagam H, Han SH, Kum KY. *Candida albicans* Virulence Factors and Pathogenicity for Endodontic Infections. *Microorganisms*. 2020 Aug 26;8(9):1300. doi: 10.3390/microorganisms8091300. PMID: 32858856; PMCID: PMC7563224.

Zhang H, Shen G, Lu H, Jiang C, Hu W, Jiang Q, Xiang X, Wang Z, Chen L. *Psidium guajava* Seed Oil Reduces the Severity of Colitis Induced by Dextran Sulfate Sodium by Modulating the Intestinal Microbiota and Restoring the Intestinal Barrier. *Foods*. 2024 Aug 24;13(17):2668. doi: 10.3390/foods13172668. PMID: 39272433; PMCID: PMC11394160.