

CAMILA FONSECA BEZERRA

COMPOSIÇÃO QUÍMICA, EFEITO ANTIFÚNGICO INTRÍNSECO E POR ASSOCIAÇÃO COM FÁRMACO DAS FRAÇÕES TÂNICA E FLAVONOÍDICA DAS FOLHAS DE *Psidium guajava* L. (Myrtaceae) FRENTE A *Candida* spp.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri– URCA, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientadora:

Prof^a. Dra. Maria Flaviana Bezerra Morais Braga

CRATO – CE

2018

CAMILA FONSECA BEZERRA

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA, EFEITO ANTIFÚNGICO INTRÍNSECO E POR
ASSOCIAÇÃO COM FÁRMACO DAS FRAÇÕES TÂNICA E FLAVONOÍDICA
DAS FOLHAS DE *Psidium guajava* L. FRENTE A *Candida* spp.**

Dissertação submetida à coordenação ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA, como requisito para obtenção do título de Mestre. Área de concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais.

Apresentada em: ____/____/____

Resultado: _____

BANCA EXAMINADORA:

Prof.^a Dra. Maria Flaviana Bezerra Moraes Braga – URCA
(Orientadora da Dissertação)

Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho – URCA
(Avaliador Interno)

Prof. Dr. Aracélio Viana Colares – UNILEÃO
(Avaliador Externo)

Prof. Dr. Francisco Assis Bezerra da Cunha – URCA
(Avaliador Interno – Suplente)

Dedico esse trabalho aos meus pais, Francisco Bezerra de Almeida e Maria Dinalmi Fonseca M. Bezerra, que não tiveram as mesmas oportunidades que eu tive, mas fizeram o impossível para que eu estivesse onde estou. Essa conquista é de vocês! E ao meu pequeno Heitor Hmõpre Fonseca Xerente, que me proporciona motivação diária para lutar a cada dia.

AGRADECIMENTOS

Ao meu amado Deus, por ter me mostrado uma saída no momento em que eu mais precisei e iluminado meus caminhos para chegar até aqui e por ter me proporcionado alegria diária, força e coragem durante toda a minha caminhada de trabalho.

Aos meus pais, Maria Dinalmi Fonseca M. Bezerra e Francisco Bezerra de Almeida, pelo grande amor e paciência dedicados a mim e ao meu filho Heitor, com muito zelo e carinho, estímulo, ensinamentos e dedicação em todas as etapas da minha vida.

Ao meu filho Heitor Hmõpre Fonseca Xerente, por ser o meu estímulo para lutar pelos meus sonhos e fazer de tudo para dar o melhor a ele.

As minhas irmãs Ana Caroline Fonseca Bezerra e Maria Clara Fonseca Bezerra pelos conselhos, carinho e apoio sempre que preciso foi.

A minha grande amiga Glauca Morgana de Melo Guedes que no momento em que mais duvidei de minha capacidade, ela me fez enxergar além, me fazendo acreditar que esse sonho era possível!

A minha confidente e irmã-amiga Camila Lopes Peixoto que sempre me apoiou em todos os momentos que precisei mesmo em tempos que me fiz ausente, devido ao tempo corrido, pude sentir nossa amizade se fortalecendo.

A minha orientadora e amiga, Dra. Maria Flaviana Bezerra Moraes Braga, por cuidar de mim como uma filha, por toda paciência, amizade, conselhos, confiança em meu trabalho e conhecimentos compartilhados, de grande importância para minha vida acadêmica e pessoal e pelas orientações para o enriquecimento deste trabalho.

Ao professor e amigo, Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho, que também considero como um segundo pai, por todo apoio prestado, ajuda diária, paciência e ensinamentos.

A minha amiga-irmã, Janaína Esmeraldo, que sempre foi minha aliada e confidente em todos os momentos, agradeço por todos os conselhos e ajudas em minha vida.

Aos meus amigos do LMBM, em especial a Thiago Sampaio, por todos os momentos de alegrias e colaboração para esse trabalho, agradeço com imenso carinho a Thassya Lucas e Rafael Cruz por toda disposição, dedicação e zelo em tudo que fazem e principalmente ao me ajudarem nos ensaios e em tudo que precisei.

A meu amigo Saulo Tintino que se prontificou a comprar e trazer os reagentes de Recife para fazer as extrações, muito obrigada!

Aos meus amados amigos Maciel, Fábria, Corrinha, Joara, Karolaine, Linkonl, Raquel, Jacqueline, Elba, Audilene, Datiane, Yedda, Amandinha e Karol por toda ajuda que foi dada a essa pesquisa, saibam que vocês moram em meu coração.

Aos meus amigos dos outros laboratórios que também contribuíram em momentos de meus estudos Maria Karollyna, Fco Pereira Junior, Andressa, Jc Débora, Allana, Débora e Wégila.

Ao Sr. Gilberto *in memoriam* e Sr. Valdemar Farias pela cordialidade e disponibilidade para coleta do material vegetal.

Ao Programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular e a todos os seus professores, em especial Prof. Dr. Cunha, Prof Dr. Irwin e Prof Dr. Galberto, pela oportunidade de realização do mestrado e pelos ensinamentos transmitidos.

À Embrapa Agroindústria Tropical pelas instalações e conhecimentos concedidos durante uma parte da realização da minha dissertação. Em especial Dra. Tigressa Rodrigues, Dr. Edy Sousa de Brito, Dr. Paulo Riceli, Dr. Guilherme Zocolo e Dr. Kirley Canuto e aos pesquisadores, Márcia, Erbênia, Sheila do Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais pela ajuda, ensinamentos e bons momentos.

À CAPES e a FINEP, pelo apoio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente tornaram possível o cumprimento de mais esta etapa.

“Os sonhos são como uma bússola, indicando os caminhos que seguiremos e as metas que queremos alcançar. São eles que nos impulsionam, nos fortalecem e nos permitem crescer.”

(Augusto Cury)

RESUMO

Psidium guajava L. (goiabeira) é uma planta amplamente utilizada para alimentação e na medicina popular em todo o mundo. Estudos demonstraram que suas folhas possuem propriedades antifúngicas, principalmente contra fungos do gênero *Candida*. As infecções por *Candida* spp. representam uma séria ameaça à saúde global e *Candida albicans* ainda é a principal responsável por candidíase invasiva na maioria das alas clínicas. Porém, uma quantidade considerável de pacientes estão sendo contaminados com espécies de *Candida* não *albicans*. Nesse estudo foram testadas frações Flavonoídica e Tânica das folhas para investigar sua composição química e o potencial antifúngico *in vitro*. Os ensaios microbiológicos foram realizados frente à *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei* por microdiluição para determinar a IC₅₀, a curva de viabilidade celular e o efeito inibidor por meio da associação das frações, em concentração subinibitória, ao Fluconazol. A Concentração Fungicida Mínima (CFM) foi realizada por subcultivo em meio sólido e os testes para verificar as mudanças morfológicas pela ação das frações foram realizados em câmaras de microcultivo em concentrações baseadas na microdiluição, Concentração Superior Avaliada - CSA/4, CSA e CSA x2. Os compostos nas folhas de goiaba foram determinados por UPLC-ESI-QTOF-MS. Os resultados obtidos por análise cromatográfica permitiram encontrar 48 compostos nas quatro frações extraídas das folhas frescas e secas, sendo grande parte de compostos fenólicos, entre estes alguns com propriedades antifúngicas. A Concentração que inibe 50% das colônias- IC₅₀ das frações isoladas e associadas entre si foram calculadas: as frações de folhas frescas variaram de 5,10 a 926,56 µg/mL e quando associadas ao fluconazol variaram entre 1,38 e 925,56 µg/mL. Já para as frações com folhas secas variaram de 69,29 a 3444,62 µg/mL, quando associadas ao fluconazol variaram entre 11,57 a 925,56 µg/mL, demonstrando que a associação do produto natural com o antifúngico apresentou um sinergismo destacado. No teste de CFM tanto nas folhas secas e frescas os valores foram semelhantes, pois na concentração ≥ 4096 µg/mL reduziram, mas não eliminaram a formação de colônias, efeito fungistático. Porém quando associadas ao FCZ frente à CK as frações de folhas frescas inibiram todo crescimento nas concentrações 512 µg/mL e 1024 µg/mL e as de folhas secas também frente à mesma cepa com 512 µg/mL e 2048 µg/mL, caracterizando um efeito fungicida. As frações afetaram a habilidade de transição morfológica, evitando a formação de pseudo-hifas e hifas. As frações flavonoídica e tânica possuem um potencial antifúngico relevante, pois causaram a inibição fúngica em uso isolado e potencializou a ação do Fluconazol, reduzindo a concentração do mesmo, coibindo o dimorfismo celular, um dos fatores de virulência, evitando a invasão de substratos. As frações tânicas mostraram-se em evidência com os melhores resultados dos testes, com um desempenho mais significativo, além disso todas as frações apresentaram efeito sinérgico no teste de associação ao antifúngico de referência. Novos estudos serão necessários para elucidar o mecanismo de ação dos produtos naturais. Estes resultados destacam a espécie como fonte promissora de compostos ativos na inibição de crescimento e de virulência de *Candida* spp.

Palavras-chave: Anti-*Candida*, fitoquímica, Fluconazol, Anti-pleomorfismo, goiaba.

ABSTRACT

Psidium guajava L. is a plant widely used for food and in folk medicine all over the world. Studies have shown that guava leaves have antifungal properties, especially against fungi of the *Candida* genus. In this study, the Flavonoid and Tannic fractions from fresh leaves were tested to investigate their chemical composition and antifungal potential *in vitro*. Compounds from the guava leaves were determined by UPLC-ESI-QTOF-MS. Microbiological assays were carried out in order to determine the IC₅₀, cell viability curve and inhibitory effect of the association of the leaf fractions with Fluconazole (FCZ), against *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida krusei* through the microdilution methodology. Minimal Fungicidal Concentration (MFC) was performed by subculture in solid media while the assays to verify any morphological changes by the fractions were performed in microculture chambers at concentrations based on microdilution, Highest Concentration Assessed - HCA/4, HCA and HCAx2. The results obtained through the chromatographic analysis allowed the identification of 48 compounds in the four fractions from the guava leaves, presenting a higher content of phenolic compounds, some of which possess antifungal properties. The IC₅₀ of the isolated and associated fractions were calculated, the fractions of fresh leaves to be between 5.10 and 926.56 µg/mL, when associated with fluconazole ranged from 1.38 to 925.56 µg/mL. The dry leaf fractions varied from 69.29 to 3444.62 µg/mL, when associated with fluconazole ranged from 11.57 to 925.56 µg/mL, demonstrating that the association of the natural product with the antifungal presented synergism highlighted. In the CFM test both in the dry and fresh leaves the values were similar, because at the concentration ≥ 4096 µg / mL reduced, but did not eliminate the formation of colonies, fungistatic effect. However, when combined with FCZ versus CK, fresh leaf fractions inhibited all growth at 512 µg / mL and 1024 µg / mL and dry leaves at the same 512 µg / mL and 2048 µg / mL concentrations, fungicidal effect. The fractions affect the morphological transition, avoiding the formation of hyphae. Flavonoid and tannic fractions have a relevant antifungal potential, as they caused the fungal inhibition in isolated use and potentiated the action of Fluconazole, reducing the concentration of the same, curbing the cellular dimorphism, one of the virulence factors, avoiding the invasion of substrates. Tannic fractions were evidenced with the best results of the tests, with a more significant performance, in addition all the fractions presented synergic effect in the test of association with the reference antifungal. New studies will be needed to elucidate the mechanism of action of these natural products. These results highlight the species as a promising source of active compounds in the growth inhibition and *Candida* spp. virulence.

Key-words: Anti-*Candida*, phytochemistry, Fluconazole, Anti-pleomorphism, guava.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estrutura Geral dos Flavonoides	22
Figura 2: Representação estrutural dos taninos hidrolisáveis e condensados	24
Figura 3: Fórmula estrutural do Fluconazol	30

ARTIGOS

Artigo 1: Atividade anti-*Candida* das frações Flavonoídica e Tânica de folhas frescas de *Psidium guajava* L.: composição química UPLC-MS-ESI-QTOF, inibição de crescimento, alterações na morfologia celular e fatores de virulência.

Figura 1: Cromatografia líquida de ultra desempenho com cromatogramas de espectrometria de alta definição (UPLC-MS) de Fração Flavonoídica (A) e Tânica (B) de folhas frescas de *Psidium guajava* no modo negativo 47

Figura 2: Principais estruturas correspondentes aos compostos identificados na Fração Flavonoídica de folhas frescas de *Psidium guajava* 52

Figura 3: Principais estruturas correspondentes aos compostos identificados na Fração Tânica de folhas frescas de *Psidium guajava* 52

Figura 4: Efeito antifúngico das frações Flavonoídicas e Tânica de folhas frescas de *Psidium guajava* individuais e associadas entre si e do Fluconazol como controle frente a linhagens de *Candida* 56

Figura 5: Efeito antifúngico das frações Flavonoídicas e Tânica de folhas frescas de *Psidium guajava* associadas com Fluconazol frente a linhagens de *Candida* 59

Figura 6: Demonstração da redução progressiva das estruturas filamentosas. 62

Figura 7: Mensuração da extensão das hifas 63

Artigo 2: Chemical analysis by UPLC-MS-QTOF and antifungal activity of *Psidium guajava* L.

Figure 1: Ultra-performance liquid chromatography with high definition 71

spectrometry (UPLC-MS) of Flavonoidic (A) and Tannic (B) fractions of <i>Psidium guajava</i> dry leaves in negative mode	73
Figure 2: Main structures corresponding to the compounds identified in the Flavonoid (A) and Tannic (B) fraction of dry leaves of <i>Psidium guajava</i>	
Figure 3: Antifungal effect of Flavonoid and Tannic fractions of individual and associated <i>Psidium guajava</i> dry leaves and Fluconazole as a control against <i>Candida</i> strains	74
Figure 4: Antifungal effect of Flavonoid and Tannic fractions of <i>Psidium guajava</i> leaves associated with Fluconazole against <i>Candida</i> strains	75
Figure 5: Demonstration of progressive hyphal reduction. A. Positive growth control, B. Regression start from 512 µg / mL and C. Total dimorphism inhibition 4096 µg / mL.	75
Figure 6: Measurement of the hyphae extension under the action of the flavonoid and tannic fractions of <i>Psidium guajava</i> dry leaves against <i>Candida albicans</i> , <i>Candida tropicalis</i> and <i>Candida krusei</i>	76

LISTA DE TABELAS

ARTIGOS

Artigo 1: Atividade anti-*Candida* de *Psidium guajava* L. (goiaba): composição química UPLC-MS-ESI-QTOF, inibição do crescimento, alterações na morfologia celular e fatores de virulência.

Tabela 1: UPLC-ESI-QTOF-MS identificação de constituintes químicos da Fração Flavonoídica de Folhas Frescas de *Psidium guajava* **48**

Tabela 2: UPLC-ESI-QTOF-MS identificação de constituintes químicos da Fração Tânica de Folhas Frescas de *Psidium guajava* **49**

Tabela 3: IC₅₀ (µg/mL) das frações flavonoídica e tânica de folhas frescas de *Psidium guajava* frente a linhagens de *Candida* **54**

Tabela 4: IC₅₀ (µg/mL) das frações flavonoídica e tânica de folhas frescas de *Psidium guajava* em associação ao Fluconazol frente a linhagens de *Candida* **59**

Artigo 2: Analysis by UPLC-MS-QTOF and antifungal activity of guava (*Psidium guajava* L.)

Tabela 1: UPLC-ESI-QTOF-MS identification of chemical constituents of the Flavonoid Fraction of Dried Leaves of *Psidium guajava* **72**

Tabela 2: UPLC-ESI-QTOF-MS identification of chemical constituents of the Dry Leaves Tannic Fraction of *Psidium guajava* **72**

Tabela 3: IC 50 (µg / mL) of the flavonoid and tannic fractions of *Psidium guajava* dried leaves against *Candida* strains **73**

Tabela 4: IC 50 (µg / mL) of the flavonoid and tannic fractions of *Psidium guajava* leaves in association with Fluconazole against *Candida* strains **74**

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Fármacos antifúngicos e seus alvos celulares

29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASD Ágar Sabouraud Dextrose

CA *Candida albicans*

CFM Concentração Fungicida Mínima

CIM Concentração Inibitória Mínima

CSD Caldo Sabouraud Dextrose

CK *Candida krusei*

CT *Candida tropicalis*

DMSO Dimetilsulfóxido

IC₅₀ Concentração capaz de inibir 50% das células

INCQS Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

LM Laboratório de Micologia

LMBM Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular

PDA Agar Dextrose de Batata - Potato Dextrose Agar

UFC Unidade Formadora de Colônia

UFPB Universidade Federal da Paraíba

UPLC Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

ESI Ionização por Electrospray

QTOF Quadrupolo “Time-of-Flight” (Tempo de Voo)

MS Espectrometria de Massas

URCA Universidade Regional do Cariri

LISTA DE SÍMBOLOS

% Percentual

® Marca registrada

°C Grau Celsius

Da Daltons

µg Micrograma

µg/mL Micrograma por mililitro

mL Mililitro

µL Microlitro

mm Milímetro

nm Nanômetro

UFC/mL Unidades formadoras de colônias por mililitro

µm Micrômetro

L/h Litro de solução por hora

mg/g Miligramas por grama

g Grama(s)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3. REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1 PRODUTOS NATURAIS	19
3.2 A FAMÍLIA Myrtaceae E O GÊNERO <i>Psidium</i>	19
3.2.1 <i>Psidium guajava</i> L.	20
3.3 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	21
3.2.1 Flavonoides	22
3.2.2 Taninos	23
3.3 LEVEDURAS DO GÊNERO <i>Candida</i>	25
3.3.1 <i>Candida albicans</i>	26
3.3.2 <i>Candida tropicalis</i>	26
3.3.3 <i>Candida krusei</i>	27
3.4 TERAPIA ANTIFÚNGICA	28
3.4.1 Azólicos: Fluconazol	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	37
5.1 RESULTADO 1- ARTIGO 1	37
5.2 RESULTADO 2- ARTIGO 2	38
6. CONCLUSÃO	79
REFERÊNCIAS	80
ANEXO A: Comprovaentes de submissão Artigo 1	91
ANEXO B: Comprovante de aceite para publicação Artigo 2	91

1. INTRODUÇÃO

O acometimento por infecções fúngicas nos seres humanos tem ganho destaque nos últimos anos e dentre os fungos mais comuns nas infecções, se destacam os do gênero *Candida*, estando entre as espécies causadoras de infecções oportunistas (ÁLVARES, 2007).

Isso se justifica pelo fato de estarem muito bem adaptadas ao corpo humano, podendo colonizá-lo sem produzir sinais de doença em condições de normalidade fisiológica. Porém, podem tornar-se patogênicas em pacientes imunossuprimidos, gerando infecções que são de difíceis diagnósticos e estão associados à elevada mortalidade e morbidade (MENEZES et al., 2013).

Quanto às manifestações clínicas, podemos dividi-las em cutaneomucosas, sistêmicas e alérgicas (BARBEDO; SGARBI, 2010). O tratamento dessas patologias é realizado com drogas sintéticas com atuação sistêmica como a anfotericina B, fluconazol, itraconazol, voriconazol e equinocandinas, sendo os azóis os mais usados, devido ao seu baixo custo e baixa toxicidade (PFALLER, 2012).

A disponibilidade de agentes antifúngicos para o tratamento de infecções sistêmicas é, de certo modo reduzido, tornando-se um problema diante de leveduras multirresistentes (KHAN et al, 2013). Além disso, um dos impasses nos dias de hoje é a resistência aos antifúngicos e as dificuldades para um tratamento efetivo (PFALLER, 2012).

Como forma de amenizar essa resistência e dificuldade no tratamento as plantas medicinais são fortemente usadas pela população para o tratamento de infecções, e esse fato tem despertado interesse de diversos centros de pesquisas para o estudo dessa atividade, com o intuito de isolamento de novas moléculas com atividade antimicrobiana (SILVA et al., 2012).

Produtos naturais de plantas têm sido avaliados não só pela sua atividade antimicrobiana direta, mas como um agente de modificação de resistência aos antifúngicos, que pode ser um efeito sinérgico ou antagônico (CHUNG et al., 2011; CALIXTO JÚNIOR et al., 2015). O uso associado de plantas medicinais ou dos seus compostos derivados pode interferir, inibindo ou intensificando o efeito terapêutico dos antimicrobianos convencionais (BASTOS et al., 2011).

A combinação de drogas com efeitos sinérgicos gera, como resultado dessa interação, aumento da eficácia do efeito terapêutico, diminuição da CIM, diminuição do desenvolvimento da resistência a antifúngicos e diminuição da toxicidade no hospedeiro (SILVA et al, 2016).

A utilização de constituintes derivados de plantas na área farmacêutica tem crescido de forma significativa, por conta da variedade das propriedades medicinais e a sua possibilidade de toxicidade menor, quando comparados às drogas sintéticas (TAN et al., 2015).

As plantas apresentam vias metabólicas originando diversos tipos de grupos de compostos. Entre eles encontram-se os alcaloides, flavonoides, quinonas, taninos ou terpenos (SIMÕES, 2017).

Os flavonoides e os taninos têm merecido destaque em virtude da sua ampla gama de ações biológicas e terapêuticas demonstradas tanto em condições experimentais como em seres humanos (NIJVELDT et al., 2011). A bioprospecção de óleos essenciais ou extratos vegetais tem sido bastante estudado, bem como o isolamento de seus compostos majoritários (ALENCAR, 2014).

O Brasil possui uma extensa diversidade vegetal na qual estão incluídas espécies do gênero *Psidium*, encontrados nos mais variados ambientes nas regiões neotropicais através de cultivo, sendo usadas tanto para a alimentação, quanto para finalidades terapêuticas (BRAGA, 2016; COSTA, 2009; FRANZON et al., 2009).

O gênero *Psidium* possui uma série de atividades biológicas comprovadas através de ensaios *in vitro* e *in vivo*, entre as quais, o efeito antifúngico (SUWANMANEE; KITISIN; LUPLERTLOP et al., 2014). Dentre as espécies desse gênero, *Psidium guajava* L., possui valor etnomedicinal, onde é conhecida por sua versatilidade terapêutica, sendo utilizada para o tratamento de sintomas associados às infecções causadas por *Candida* spp. (MORAIS-BRAGA et al., 2016).

Com base nos fatores citados acima, esse estudo consiste na investigação da composição química, ação antifúngica, efeito modulador do fluconazol e anti-pleomorfismo, das frações flavonoídicas e tânicas (*in vitro*) obtidos das folhas de *P. guajava* L. (goiaba) contra cepas de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei*.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

Investigar e avaliar a ação antifúngica das frações flavonoídica e tânica (*in vitro*) de folhas *P. guajava* L. (goiaba) sobre cepas de *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Realizar a prospecção fitoquímica das frações;
- Determinar a IC_{50} das frações isoladas, associadas entre si e do fluconazol sozinho e em combinação;
- Identificar o tipo de efeito antifúngico (fungicida ou fungistático) através da determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM), das frações e do fluconazol;
- Verificar se as frações, em concentração sub-inibitória (CFM/16), exercem efeito sobre a ação de antifúngico comercial (fluconazol) quando associados;
- Averiguar a ação das frações e do fluconazol sobre o dimorfismo celular de leveduras de *Candida*.

3. REVISÃO DE LITERATURA:

3.1 PRODUTOS NATURAIS

Ao longo dos tempos o conhecimento popular vem sendo transmitida de forma empírica entre as gerações. O conhecimento tradicional sobre o uso das plantas é vasto e, em muitos casos, é o único recurso disponível que a população rural de países em desenvolvimento tem ao seu alcance (AGRA et al., 2008; DE JESUS, 2009). Os produtos naturais e seus derivados vem sendo reconhecidos por muitos anos como originários de agentes terapêuticos e de diversidade estrutural (LAHLOU, 2013).

Por milhares de anos, as plantas medicinais têm sido uma rica fonte de agentes terapêuticos e muitos dos medicamentos encontrados na atualidade são derivados de produtos naturais. Os vegetais representam as maiores fontes de compostos ativos que podem ser usadas na terapêutica, devido à grande diversidade estrutural de metabólitos produzidos. Nos últimos anos tem havido um renascimento do interesse em fármacos naturais ou à base de plantas. Esses compostos podem agir em associação no corpo humano e podem fornecer propriedades terapêuticas únicas (ATANASOV et al., 2015; BRANDÃO et al., 2010; HUIE, 2002).

Inúmeros compostos derivados de plantas medicinais têm sido utilizados como protótipos para a síntese de novos agentes terapêuticos. Isso proporciona a elaboração de diversos fármacos com funções terapêuticas diversificadas (BARBOSA-FILHO et al., 2007; NEWMAN; GRAGG, 2012) podendo melhorar a atividade e diminuir a toxicidade de tratamento antifúngico (HARVEY et al., 2015).

3.2 A FAMÍLIA *Myrtaceae* E O GÊNERO *Psidium*

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

Possui grande importância econômica, uma vez que várias espécies são utilizadas na alimentação, fornecem madeiras, possuem propriedades medicinais e potencial ornamental. Entre as espécies apreciadas por seus frutos temos a goiaba (*Psidium guajava* L.), a uvaia (*Eugenia uvalha* L. e *Eugenia pyriformes* L.), a pitanga

(*Eugenia uniflora* L.), a cerejeira (*Eugenia bracteata* Vell.), o jambo (*Syzygium jambos* (L.) Alston), além da jaboticaba (*Plinia cauliflora* L.) e do cambuci (*Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum), também utilizadas na fabricação de licores (BARROSO 1991; KAWASAKI e LANDRUM, 1997, SOBRAL et al., 2015).

3.1.1 *Psidium guajava* L.

Popularmente conhecida como goiabeira (*Psidium guajava*) atualmente, a espécie se estende ao longo de áreas tropicais e subtropicais do planeta (ORWA et al., 2009; DA SILVA, 2013). Existem aproximadamente 324 espécies de goiabas conhecidas nas regiões tropicais da América Central e América do Sul, espalhadas e cultivadas principalmente em países subtropicais e tropicais (LIMA et al., 2010).

No Brasil a espécie pode ser encontrada em todas as regiões do país, (SOBRAL et al., 2015). *P. guajava* pode ser conhecido por sinônimos, como *Guajava pumila* (Vahl) Kuntze, *Guajava pyrifera* (L.) Kuntze, *Myrtus guajava* (L.) Kuntze, *Psidium angustifolium* Lam., *Psidium cujavillus* Burm.f., *Psidium cujavus* L., *Psidium fragrans* Macfad., *Psidium igatemyense* Barb. Rodr., *Psidium intermedium* Zipp. ex Blume, *Psidium pomiferum* L., *Psidium prostratum* O. Berg, *Psidium pumilum* Vahl, *Psidium sapidissimum* Jacq., *Psidium vulgare* Rico. e *Syzygium ellipticum* K. Schum. & Lauterb (THE PLANT LIST, 2016).

A espécie *P. guajava* além do uso como alimento, possui outras partes que são utilizadas, como as folhas, para tratar doenças. Esta planta fornece compostos terapêuticos amplamente utilizados isoladamente ou em combinação com outras plantas de importância medicinal por pessoas locais em todo o mundo (GUTIÉRREZ et al., 2008; SANDA et al., 2011).

Com um considerável destaque no uso medicinal, *P. guajava* tem suas partes utilizadas para o tratamento de diversas enfermidades, tais como infecções respiratórias, intestinais e urinárias, cólera, diabetes, hipertensão, dores, doenças sexualmente transmissíveis, doenças de pele, gastrites, úlceras, micoses, aftas, diarreia, entre tantas outras, sendo preparada na forma de decocção, infusão, tintura, pasta e pó (BARBALHO et al., 2012; BORBA e MACEDO, 2006; GUTIÉRREZ, MITCHELL & SOLIS, 2008; SHRUTHI et al. 2013, MORAIS-BRAGA et al., 2017).

Concomitantemente, os pesquisadores têm realizado estudos para investigar o potencial antifúngico de algumas espécies vegetais, como a goiabeira em razão de sua extrema riqueza em biomoléculas naturais, que apresentam atividades significativas e que devido à sua composição química, muitas vezes, minimizam o desenvolvimento de resistência dos patógenos e, geralmente, apresentam baixa toxicidade para as células de mamíferos (LEE et al., 2013).

3.2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

O metabolismo dos vegetais é definido como o conjunto total das transformações e reações das moléculas orgânicas, catalisadas por enzimas, que ocorre nas células vivas, suprindo o organismo de energia, renovando suas moléculas e garantindo a continuidade do equilíbrio vegetal (MARZZOCO & TORRES, 2007; PEREIRA & CARDOSO, 2012), ocorrendo que plantas da mesma espécie possam ter metabólitos diferentes.

Essas reações possuem certa direção devido à presença de enzimas específicas, estabelecendo, assim, as rotas metabólicas, visando o aproveitamento de nutrientes para satisfazer as exigências fundamentais da célula. Além do metabolismo primário, responsável pela síntese de celulose, lignina, proteínas, lipídeos, açúcares e outras substâncias importantes para a realização das funções vitais, as plantas também apresentam o chamado metabolismo secundário (CHAMPE et al., 2008).

Os metabólitos secundários, geralmente de estrutura complexa, baixo peso molecular, possuem atividades biológicas marcantes e, diferentemente dos metabólitos primários, apresentam-se em baixas concentrações e em determinados grupos de plantas (BERG, LUBERT, 2008).

É sabido que a ingestão de alguns desses metabólitos interferem em diversos processos fisiológicos, e auxilia na absorção e na ação de vitaminas, por atuar nos processos de cicatrização, como antioxidantes, além de apresentarem atividade antimicrobiana (MENEZES, 2009). Dentre as classes podemos citar os flavonoides e taninos, onde suas atividades podem interferir em diversos processos fisiológicos, entre eles o auxílio na absorção e na ação de vitaminas, podendo atuar nos processos de cicatrização, como antioxidantes, além de apresentarem atividade antimicrobiana (OLIVEIRA et al., 2013).

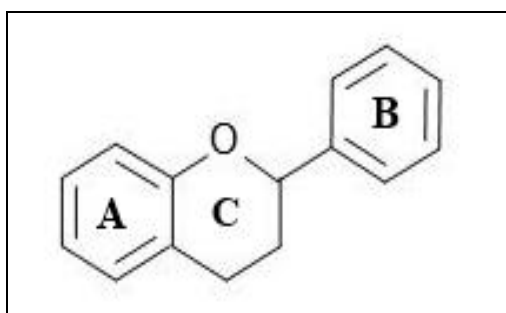
3.2.1 Flavonoides

Os flavonoides são substâncias aromáticas contendo 15 átomos de carbono (C15) no seu esqueleto básico (Figura 1). Este grupo de compostos polifenólicos possui uma estrutura comum caracterizada por dois anéis aromáticos e um heterociclo oxigenado, formando um sistema C6-C3-C6. Já foram identificadas mais de 8.000 substâncias pertencentes a este grupo (PEREIRA, 2015).

Quimicamente são compostos derivados da via do ácido chiquímico-acetato, caracterizados por apresentarem dois núcleos fenólicos ligados por uma cadeia de três carbonos (HARBONE, 1984; HARBONE et al., 2000). Essa classe do metabolismo secundário das plantas é obtida da via dos fenilpropanoides, os chamados polifenóis (ZUANAZZI; MONTANHA, 2003).

Suas principais classes são as antocianinas, flavanas, flavonas, os flavonois e isoflavonoides (LAZARY, 2010). São considerados um dos maiores grupos de metabólitos secundários das plantas, e encontrados amplamente em frutas, folhas, chás e vinhos, podendo ser pigmentos naturais com papel importante, tendo como função principal proteger estes organismos contra agentes oxidantes (LOPES et al., 2010).

Figura 1: Estrutura geral dos Flavonoides. Composta por dois anéis benzênicos (A e B) ligados através de um anel pirano (C).



Fonte: Adaptado de Beecher, 2003.

Os flavonoides possuem múltiplos efeitos biológicos, como atividade antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral, poder de redução da fragilidade e permeabilidade capilares; inibição da destruição do colágeno a agregação plaquetária

(ARAÚJO, 2008; FILHO et al., 2001), ações antimicrobianas e, em especial pela ação antifúngica (SOMNEZ et al., 2005; CUSNHIE & LAMB, 2005).

Em testes realizados com animais, estes compostos demonstram possuir atividade terapêutica, como por exemplo, aos sistemas imunológico, circulatório, cardiovascular e nervoso (GEORGIEV et al., 2014).

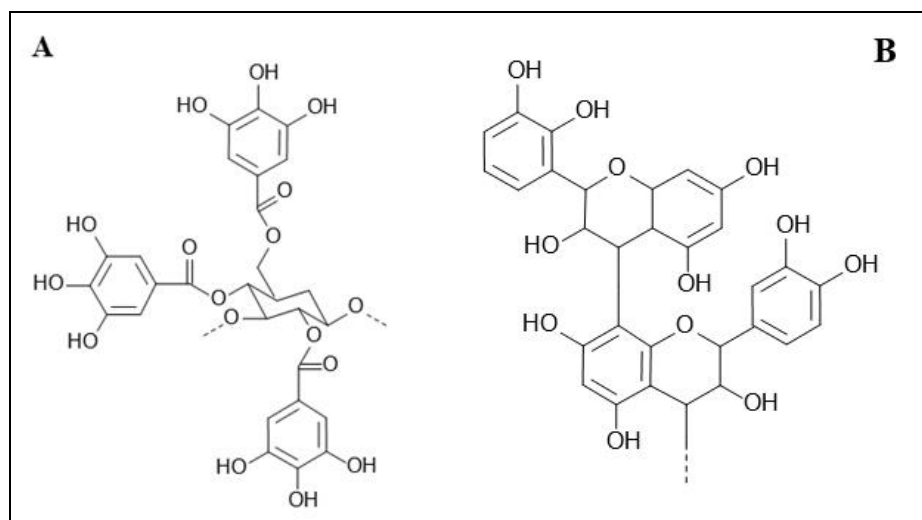
3.2.2 Taninos

São compostos fenólicos altamente reativos quimicamente que formam pontes de hidrogênio, intra e intermoleculares (MONTEIRO et al. 2005). Os taninos são classificados de acordo com a estrutura química em dois grupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados. Taninos hidrolisáveis possuem um grupo poliol central (em sua maioria, é β -d- glicose, mas também o ácido quínico, outros fenóis e outros glicósidos); e hidroxilas esterificadas pelo ácido gálico (parte fenólica) (KHANBABAEI & REE, 2001).

Os taninos hidrolisáveis (Figura 2A) derivados de esqueletos (C6 e C1)_n, que apresentam na sua constituição monômeros de ácido gálico (tanino gálico) ou ácido elágico (tanino elágico) e os taninos condensados (Figura 2B) protocianidinas, derivados de esqueletos (C6-C3-C6)_n, que são formados pela polimerização de unidades de catequina (CARVALHO, 2016).

São utilizados pela indústria no curtimento de couros e peles, no ramo petrolífero como agentes dispersantes, no controle da viscosidade de argilas na perfuração de poços (PAES et al., 2006; TANAC, 2012), também utilizados no tratamento de água de abastecimento e residuais (PELEGRINO, 2011; KLUMB & FARIA, 2012; TANAC, 2012), na produção de tintas e adesivos para madeira e derivados (TRUGILHO et al., 1997) e, em virtude de suas propriedades antissépticas, vêm sendo testados contra organismos xilófagos (VITAL et al., 2001; TRUGILHO et al., 2003; COLLI et al., 2007).

Figura 2: Representação estrutural dos taninos A- Hidrolisáveis e B- Condensados.



Fonte: Adaptado de Paiva et al., 2002

Estes compostos são facilmente oxidáveis, tanto por enzimas vegetais específicas quanto por influência de metais, como cloreto férrico, o que ocasiona o escurecimento de suas soluções (MELLO & SANTOS, 2001).

Possuem a habilidade de formar complexos insolúveis em água com alcaloides, gelatina e outras proteínas, características nas quais são baseados os principais testes de detecção. A complexação entre taninos e proteínas é a base para suas propriedades como fator controlador de insetos, fungos e bactérias, assim como para seus principais usos industriais, como a manufatura do couro (CASTEJON, 2011).

As aplicações de drogas juntamente com taninos estão relacionadas, com suas propriedades adstringentes. Por via interna exercem efeito antidiarreico e antisséptico, por via tópica formam uma camada protetora da parte mais expostas da pele e mucosas, defendendo assim as camadas subjacentes. Ao precipitar proteínas, os taninos propiciam um efeito antimicrobiano e antifúngico (BRUNETON, 1991).

Pesquisas farmacológicas já demonstraram o potencial dos taninos encontrados na casca do caule de *Stryphnodendron adstringens*, com propriedades como (PANIZZA et al., 1988), atividade analgésica e anti-inflamatória (LIMA, MARTINS & SOUZA, 1998) e efeitos gástricos anti-ulcerogênicos (AUDI et al., 1999). Outros estudos também verificaram que os taninos têm atividade inibidora contra protistas parasitas (HERZOG et al., 2002; HOLETZ et al., 2005; LUIZE et al., 2005), vírus (FELIPE et al., 2006) e bactérias (LIMA; MARTINS & SOUZA, 1998; AUDI et al., 2004).

3.3 LEVEDURAS DO GÊNERO *Candida*

O gênero é constituído de aproximadamente 200 diferentes espécies de leveduras. Entre as espécies que o compõem, *Candida albicans* apresenta maior relevância em função de sua taxa de prevalência em condições de normalidade e de doença (ÁLVARES, 2007).

Fungos do gênero *Candida* são organismos eucariontes que possuem parede celular, composta por uma camada interna de quitina e β -1-3-glucano, sobre a qual outros polissacarídeos e glicoproteínas estão aderidos (ERWIG; GOW, 2016). Possuem morfogênese celular variada, podendo se apresentar na forma de levedura, hifa e/ou pseudohifa e podem se organizar em dois estilos de vida planctônico e em biofilme (WONG et al., 2014). Em cultura com ágar Sabouraud dextrose (ASD) estes microorganismos se desenvolvem formando colônias de coloração de branca a bege com textura glabra ou lisa, brilhante ou seca (LACAZ; DUPONT, 2002; SILVA et al., 2012).

O delicado balanço entre o hospedeiro e esse fungo comensal pode-se transformar em uma relação parasitária, com o desenvolvimento de infecções denominadas candidíases (BARBEDO, 2010). O estabelecimento da infecção está geralmente associado a fatores predisponentes, como imunossupressão e o uso indiscriminado de antibióticos de largo espectro (PELEG et al., 2010; GOW et al., 2011; WILLIAMS et al., 2013).

Um exemplo de patologia por leveduras é a candidíase vulvovaginal, que corresponde a segunda infecção vaginal mais comum, com 50 a 75% das mulheres que sofrem dessa infecção pelo menos uma vez na vida e 5-8% desenvolvendo uma forma crônica e grave conhecida como recorrente candidíase vulvovaginal (CASSONE, 2015; SOBEL, 2016).

De acordo com Wisplinghoff et al. (2014), no ranking de infecções microbianas as espécies pertencentes ao gênero *Candida* ocupam a quarta colocação e configuram-se como os patógenos mais comuns de seres humanos.

Podemos encontrar rotineiramente na literatura outros agentes da candidíase, como por exemplo: *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. lusitaniae*, *C. viswanathii*, *C. famata*, dentre outras (BARBEDO, 2010).

Em *Candida* spp. a morfologia fúngica é um fator de grande importância tanto na invasão quanto na evasão das células hospedeiras. A forma leveduriforme (blastoconídio) parece dar início ao processo infeccioso, no entanto possui um potencial infectante reduzido quando comparada as formas pseudo-hifas e /ou hifas verdadeiras, que mostram ser mais invasivas e resistentes ao sistema imune do hospedeiro, sendo estas difíceis de serem fagocitadas, devido a sua morfologia e ao tamanho. Estas formas alongadas estão relacionadas ao agravamento de estados patológicos (ROMÁN et al., 2007).

3.3.1 *Candida albicans*

Candida albicans é a espécie em destaque na patogênese da candidíase, principalmente em função dos seus fatores de virulência e patogenicidade, como a capacidade de diferenciação de levedura para hifa (dimorfismo), expressão de fatores de adesão e a secreção de enzimas hidrolíticas (SILVA et al., 2012), favorecendo o seu desenvolvimento mais frequente, em relação às demais espécies (CORONADO-CASTELLOTE e JIMÉNEZ-SORIANO, 2013).

Podem existir três morfologias diferentes para a célula de *C. albicans*: a levedura, a pseudohifa e a hifa. Enquanto as leveduras crescem por brotamento, nas pseudohifas, as células sofrem alongamento, mas não se separam da célula-mãe e mantêm constrições nas junções septais. Já as hifas se apresentam como células alongadas de aspecto tubular sem, no entanto, possuir constrições nas junções septais (KIM e SUDBERY, 2011).

Aproximadamente 90% de *Candida* isolados do líquido vaginal são identificados como *Candida albicans*, enquanto a minoria dos casos é causada por *Candida* não-*albicans*. No entanto, o número de casos de vaginite fúngica causados por não-*albicans* aumentou ao longo dos anos (CASSONE, 2015; GONÇALVES et al., 2016; SOBEL, 2016).

O aumento da frequência nos casos de candidíase, pode estar relacionado a constante exposição a antifúngicos, consequentemente havendo o surgimento de cepas multirresistentes, por sua vez infecções causadas por espécies de *Candida* não-*albicans* tem aumentado cada vez mais (LÓPEZ-MARTÍNEZ, 2010).

3.3.2 *Candida tropicalis*

A espécie *Candida tropicalis* apresenta pseudomicélio bem desenvolvido ou

rudimentar, algumas linhagens apresentam micélio verdadeiro e reproduzem-se por brotamento do blastoconídio. As colônias têm coloração branca a creme, ou membranosas de superfície lisa ou rugosas (MENDES et al., 2005; (NADALIN; FURTADO, 2011)

Apesar de sua relevância como patógeno humano, o seu potencial enquanto agente infeccioso ainda é pouco conhecido (MORALEZ et al., 2014). Entretanto, diversos fatores de virulência da espécie estão relacionados à sua patogenia, sendo alguns já conhecidos, e outros ainda em processo de estudo. Estes fatores de virulência são comuns à maioria das espécies de *Candida*, mas apresentam atributos específicos (DEORUKHKAR; SAINI; MATHEW, 2014). O surgimento de cepas de *C. tropicalis* resistentes a múltiplos fármacos revelou a importância de desenvolver novos medicamentos antifúngicos (SPAMPINATO; LEONARDI, 2013; RAJASEKHARAN et al., 2015).

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

3.3.3 *Candida krusei*

Candida krusei foi descrita como um agente causador de infecções fúngicas sistêmicas em pacientes suscetíveis, resultando nas menores taxas de sobrevivência, entre 90 dias (53,6%) entre *Candida* spp comum. (PFALLER et al.,2012). Embora a prevalência de *C. krusei* permaneça baixa (2%) entre infecções fúngicas (PFALLER et al., 2011), sua resistência intrínseca ao fluconazol aumenta preocupação epidemiológica e terapêutica.

Essa espécie tem se revelado como um patógeno hospitalar ocasional, acometendo geralmente, pacientes portadores de patologias hematológicas cancerígenas e/ou submetidos a transplante de medula óssea (WEN et al., 1995). *C. krusei* é a quarta espécie não-*albicans* mais comum relacionada à candidíase invasiva e à candidemia, representando aproximadamente de 2,7% das espécies não-*albicans* isoladas nos Estados Unidos (PFALLER et al., 2014).

Além disso, o número de isolados desta levedura nestes tipos de infecções aumentou ao longo do tempo (PFALLER et al., 2014). Em particular, os pacientes com malignidades hematológicas e transplantes de medula óssea demonstraram estar em maior risco de infecção por *C. krusei* (WINGARD et al., 1991; PFALLER et al., 2008).

Sendo essa espécie intrinsicamente resistente ao fluconazol, alguns estudos apontam a resistência inata ao azole de *C. krusei* à atividade de bomba de efluxo, nomeadamente através do transportador de cassete de ligação a ATP *Abc1p* e redução da acumulação de drogas, no entanto os mecanismos ainda não são precisamente compreendidos (KATIYAR e EDLIND, 2001; LAMPING et al., 2009).

3.4 TERAPIA ANTIFÚNGICA

Para o tratamento das infecções causadas por *Candida* spp. recomenda-se o uso de antifúngicos, mesmo que ainda haja uma escolha limitada, desde os anos 90 que há o crescimento e descobertas crescentes de componentes e classes antifúngicas tais como os polienos, azólicos, equinocandinas e análogos de nucleosídeos (PARAMYTHIOTOU et al., 2014; SARDI et al., 2013). De acordo com Murray et al. (2015) os fármacos antifúngicos em disposição no mercado podem ser classificados com base no seu alvo de atuação na célula fúngica.

Atualmente, vários fármacos podem ser utilizados no tratamento das infecções causadas por fungos (Quadro 1), porém, essa “diversidade” torna-se relativamente pequena, quando lembramos o arsenal de drogas disponíveis para o tratamento de infecções bacterianas (SILVA, 2016).

Isso é atribuível à natureza eucariótica das células fúngicas e a dificuldade de encontrar alvos únicos não compartilhados com hospedeiros humanos (GÓES, 2009). Quando se trata de uma doença sistêmica causada por *Candida* spp. é essencial que o tratamento seja apropriado e tratado precocemente para assim, reduzir a taxa de mortalidade, o tempo de permanência no hospital e os custos associados aos manejo clínico (AHMED et al., 2015; ALCAZAR-FUOLI & MELLADO, 2014; KÖEHLER et al., 2014).

Quadro 1. Fármacos antifúngicos e seus alvos celulares

CLASSE	FÁRMACO	ALVO NA CÉLULA	EFEITO
POLIENOS	Anfotericina B	Ergosterol	Fungicida
AZÓLICOS	Fluconazol Itraconazol Voriconazol Posaconazol	Síntese do ergosterol	Fungistático
EQUINOCANDINAS	Caspofungina Micafungina Anidulafungina	Síntese de β -(1, 3)-D- -glucano	Fungicida
ANÁLOGOS DE NUCLEOSÍDEOS	Flucitosina	Síntese do DNA e RNA	Fungistático

Fonte: (Adaptada de Cuenca-Estrella, 2010; Sardi et al., 2013)

3.4.1 Azólicos: Fluconazol

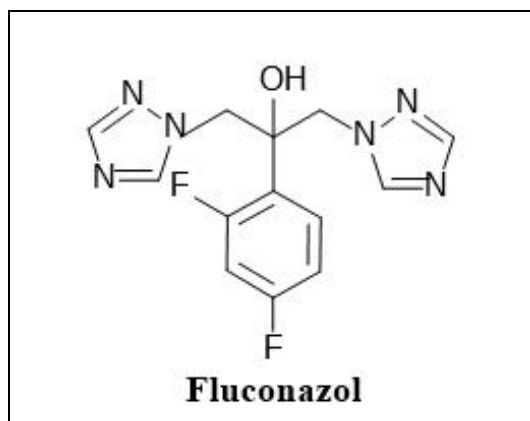
Os azóis constituem a maior classe de agentes antifúngicos, sendo esta caracterizada por compostos sintéticos heterocíclicos com anel pentagonal (Figura 3) (MURRAY et al., 2015). Geralmente atuam com uma ação fungistática contra leveduras, como espécies de *Candida*, porém pode atuar como fungicida contra fungos filamentosos, como *Aspergillus* (SHAPIRO, ROBBINS & COWEN, 2011).

Os azólicos atuam inibindo a biossíntese do ergosterol nos fungos, principal esterol presente na membrana celular fúngica. Esta alteração acontece por meio da inibição da enzima 14 α -desmetilase, microssômica do citocromo P450, que catalisa a remoção oxidativa do grupo 14 α -metil do lanosterol, impossibilitando, dessa forma a conversão do lanosterol em ergosterol. O comprometimento da biossíntese do ergosterol e o acúmulo de lanosterol (14 α -metil esterol, tóxico as células fúngicas) resultam na desagregação do arranjo lipídico da membrana, acarretando então o aumento da permeabilidade e interferência na ação de enzimas associadas à membrana, inibindo assim o crescimento e replicação dos fungos (MOHR et al., 2008).

Com exceção de *C. glabrata* que apresenta pouca suscetibilidade e de *C. krusei* que é possui resistência intrínseca, o fluconazol é eficaz contra grande parte das

Candida spp. (BRUDER-NASCIMENTO et al., 2010; PARAMYTHIOTOU et al., 2014).

Figura 3 Fórmula estrutural do fluconazol



Fonte: Adaptado de França et al., 2014.

É uma molécula de baixo peso molecular, hidrossolúvel (Figura 4), sua administração pode ser feita oralmente ou por via endovenosa, demonstrando um grande perfil de segurança. Com mais de 90% de biodisponibilidade oral e a sua absorção não é alterada nem por alimentos nem pelo pH gástrico. Atingindo melhor atuação com 1 a 2 horas após a ingestão e, por ter uma reduzida ligação às proteínas plasmáticas, grande parte do fármaco ingerido mantém-se livre em circulação (PARAMYTHIOTOU et al., 2014; SPAMPINATO & LEONARDI, 2013).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ÁREA DE COLETA

O material vegetal foi coletado em área rural no município de Crato, sul do Ceará, Brasil (425m, 07° ,14' ,18" de latitude Sul e 39° ,23' ,37" de longitude West de Greenwich). O período de coleta foi feito entre as 8:30 h e as 10:30 h da manhã no mês de março/2017. Do material coletado foi produzida uma exsicata que posteriormente foi depositada no Herbário Caririense Dárdano de Andrade-Lima (HCDAL) da Universidade Regional do Cariri – URCA, identificada por Karina Vialves Linhares, como *Psidium guajava* L., família Myrtaceae, e registrada sob o número 13.222.

4.2 MATERIAL VEGETAL

O estudo foi realizado utilizando folhas jovens e sem indicativo de contaminação por parasitas de *Psidium guajava* L. de dois espécimes, conhecida localmente como goiaba. Para obtenção das frações utilizou-se folhas frescas e secas, sendo as mesmas posteriormente trituradas em pequenas partes para obtenção das frações.

4.3 EXTRAÇÃO DA FRAÇÃO TÂNICA

Para a preparação da Fração Tânica, 20 g das folhas trituradas foram misturadas com 50 mL da solução acetona/água (7:3), posteriormente colocada durante 30 minutos em banho ultrassom a 5 °C. O resíduo foi filtrado e o procedimento foi repetido por mais duas vezes. As fases líquidas foram juntas e levadas para rotaevaporador para retirada da acetona. A fase aquosa foi particionada com 50 mL de Éter de Petróleo (Figura 6), por três vezes, posteriormente a amostra foi congelada e posteriormente liofilizada (TERRILL et al., 1992).

4.4 EXTRAÇÃO DA FRAÇÃO FLAVONOÍDICA

Para a extração da Fração Flavonoídica utilizamos 10 g do material vegetal adicionamos 100 mL de hexano (P.A), com auxílio do banho ultrassom, aquecendo a 5

°C, por dez minutos e em seguida levou-se à centrífuga (3.000 rpm) por dez minutos. O material foi filtrado e os procedimentos foram repetidos por mais duas vezes. Em seguida ao resíduo obtido anteriormente, foi adicionado 100 mL de clorofórmio, levado ao banho ultrassônico por dez minutos, seguindo os mesmos passos anteriores. Na última fase adicionamos 50 mL de acetato de etila, posteriormente levado ao evaporador rotativo (BARBOSA et al., 2004).

4.5 IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRAEFICIÊNCIA ACOPLADA A SISTEMA DE QUADRUPOLO/TEMPO DE VOO (UPLC-QTOF)

A identificação dos compostos presentes nas frações foi realizada em sistema Acquity® UPLC acoplado a um sistema de Quadrupolo/Tempo de Voo (QTOF) (Waters Corporation, Milford, EUA), no Laboratório de Química e Produtos Naturais, Embrapa Agroindústria Tropical (Fortaleza, Ceará). As corridas cromatográficas foram realizadas em coluna Waters Acquity® UPLC BEH (150 x 2,1 mm; 1,7 µm), temperatura fixa de 40 °C, fases móveis água com 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (B), gradiente variando de 2% a 95% B (15 min), fluxo de 0,4 mL/min e volume de injeção de 5 µl. O modo ESI foi obtido na faixa de 110-1180 Da, temperatura da fonte fixa a 120 °C, temperatura de dessolvatação de 350 °C, fluxo do gás dessolvatação de 500 L/h, cone de extração de 0,5 V, voltagem capilar de 2,6 kV. O modo ESI+ foi adquirido na faixa de 110-1180 Da, temperatura da fonte fixa de 120°C, temperatura de dessolvatação de 350 °C, fluxo do gás dessolvatação de 500 L/h e voltagem do capilar de 3,2 kV. Leucina encefalina foi utilizada como lock mass. O modo de aquisição foi MSE (espectrometria de massas de alta energia). O instrumento foi controlado pelo software Masslynx® 4.1 (Waters Corporation, Milford, EUA).

4.6 ENSAIOS ANTIFÚNGICOS

4.6.1 Cepas e meios de cultura

As cepas utilizadas foram do tipo padrão obtidas da Coleção de Cultura Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) do Instituto Brasileiro de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), sendo elas *Candida albicans* 40006, *Candida tropicalis* 40042 e *Candida krusei* 40095 como podem ser vistas na Figura 8. As estirpes foram inoculadas em Sabouraud Dextrose Agar (SDA, KASVI) e incubadas durante 24h a 37° C. Posteriormente, alíquotas de levedura foram transferidas para tubos de ensaio contendo cada um 3 mL de solução de Cloreto de Sódio estéril (0,9%). A concentração do inóculo foi padronizada comparando-se à escala 0.5 de McFarland. O Caldo Sabouraud Dextrose (SDB, HIMEDIA), duplamente concentrado foi utilizado nos testes de microdiluição. Na análise micromorfológica foi usado o Potato Dextrose Agar (PDA) empobrecido acrescido de ágar bacteriológico.

4.6.2 Drogas, reagentes e preparação de soluções

O dimetil sulfóxido (DMSO, Merck, Darmstadt, Alemanha) foi utilizado para a diluição das frações, e o fluconazol antifúngico (Cápsula – Prati donaduzzi), diluído em água, foi utilizado como medicamento de referência. A solução do produto foi preparada pesando 0,05 g das frações e depois diluímos em 1 mL de DMSO. Para obter a concentração desejada para o teste, as frações foram ainda diluídas em água destilada estéril (4.096 µg/mL) de modo que a concentração de DMSO não exercesse qualquer atividade nas células dos testes (STOPPA et al., 2009).

4.6.3 Determinação da IC₅₀ e obtenção da curva de viabilidade celular

Nesse teste utilizamos as frações isoladas e combinadas entre si através do método de microdiluição em caldo em placas de 96 poços. Cada poço foi preenchido com 100 µL de CSD contendo 10% de inóculo fúngico e, em seguida, foram adicionados 100 µL do produto natural (4.096 µg/mL) ou fluconazol (referência antifúngica) na mesma concentração, ao primeiro poço seguido a diluição em série. As

concentrações nos poços variaram de 2 a 2048 µg/mL. O último poço foi utilizado como controle de crescimento (JAVADPOUR et al., 1996). Foram também preparados controles para o diluente dos produtos (com solução de Cloreto de sódio 0,9% no lugar do inóculo) e controle de esterilidade do meio. Todos os testes foram realizados em quaduplicata. As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 h e posteriormente lidas num espectrofotômetro ELISA (Thermoplate®) a um comprimento de onda de 630 nm. Os resultados obtidos na leitura ELISA foram utilizados para construir a curva de viabilidade celular e a IC₅₀ das frações (MORAIS-BRAGA et al., 2016).

4.6.4 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Para este teste, a ponta de uma haste estéril foi inserida em cada poço da placa do teste de microdiluição após a incubação de 24 h (exceto no controle de esterilidade). Depois de misturar o meio em cada poço, a haste foi levada a uma placa de Petri contendo SDA, com auxílio de uma cartela guia fixada no fundo da placa para a subcultura de levedura. Após 24 h de incubação, as placas foram inspecionadas para qualquer formação de colônias de *Candida* (ERNST et al., 1999, com modificações). A concentração em que não houve crescimento de colônias de fungos foi considerada a CFM do produto natural.

4.6.5 Avaliação do efeito modificador da ação do Fluconazol

Inicialmente foi verificada a ação das frações e do fluconazol, individualmente sob o crescimento de leveduras. E neste teste foi avaliado o efeito das frações isoladas e combinação das frações com a droga de referência, para constatar se houve ou não potencialização da ação do antifúngico pelas frações. Para tanto, utilizou-se o produto natural em concentração subinibitória (CFM/16), de acordo com a metodologia utilizada por Coutinho et al. (2008 modificado). Caso a fração potencialize a ação do antifúngico, o efeito verificado é considerado do tipo sinérgico, caso prejudicasse a atuação deste, ficaria constatado um efeito antagônico. As placas foram preenchidas com 100 µL de meio + inóculo + fração e em seguida microdiluídas com 100 µL do fluconazol na concentração de 4.096 µg/mL foi adicionado em cada primeiro poço da coluna, para que sofresse diluição seriada em concentrações que variaram de 2 a 2048 µg/mL. As placas

foram incubadas a uma temperatura de 37 °C por 24 horas. A leitura foi realizada em aparelho de espectrofotometria de ELISA (Thermoplate®).

4.6.6 Efeito das frações e do fluconazol na morfologia fúngica

Para determinar se as frações individualmente e combinadas causaram alterações na morfologia fúngica, ao inibir a expressão de transição morfológica, considerado um importante fator de virulência fúngica. Câmaras úmidas estéreis para microcultivos foram preparadas para observação das leveduras. Três mililitros de meio de PDA empobrecido por diluição foram vertidos sob a lâmina, contendo a Concentração Superior Avaliada - CSA x2 (4096 µg/mL), CSA (2048 µg/mL) e CSA/4 (512 µg/mL). Alíquotas dos subcultivos foram retiradas das placas de Petri para fazer duas estrias paralelas no meio sólido (PDA), que foram posteriormente cobertas com uma lamínula estéril. As câmaras foram colocadas na incubadora durante 24 h (37°C) e inspecionadas e registradas por um microscópio óptico (AXIO IMAGER M2-3525001980- ZEISS- Alemanha) de luz usando uma objetiva 20X. Foi realizado um controle para o crescimento de levedura (hifas estimuladas em meio carente de nutrientes), bem como um controle com o fluconazol antifúngico convencional para fins comparativos. Os ensaios foram realizados de acordo com Sidrin e Rocha (2010) e Mendes (2011), com modificações no que diz respeito a concentrações e meio utilizados.

4.6.7 Mensuração da extensão das estruturas filamentosas

A partir do software *Zen* foi possível mensurar as extensões atingidas pelas hifas e os valores de redução após ação das frações. Foram retiradas cinco fotos de cada lâmina por concentração e de cada foto foram escolhidas aleatoriamente dez hifas a serem medidas, após isso foi realizado a média aritmética do comprimento de cada lâmina e no final as médias foram compiladas.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram verificados quanto à sua distribuição normal e depois analisados por ANOVA de duas vias ($P < 0.05$; $*P < 0.1$; $****P < 0.0001$), comparando os valores para cada concentração do extrato, ponto a ponto, com o teste *post hoc* de Bonferroni. Os valores de IC_{50} foram obtidos por regressão não linear com interpolação de incógnitas de curvas padrão obtidas a partir dos valores do crescimento fúngico em função da concentração do extrato e expressos em $\mu\text{g/mL}$. Para a análise estatística, foi utilizado o software Graphpad Prism, v. 5.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da pesquisa serão apresentados em duas subseções denominadas Resultado 1 e Resultado 2. No resultado 1 constam as análises feitas com as Frações Tânica e Flavonoídica de folhas frescas e os Resultados 2 as Frações Tânica e Flavonoídica de folhas secas de *P. guajava*.

Os dados obtidos são disponibilizados em dois artigos intitulados:

1. Atividade anti-*Candida* das frações Flavonoídica e Tânica de folhas frescas de *Psidium guajava* L.: composição química UPLC-MS-ESI-QTOF, inibição de crescimento, alterações na morfologia celular e fatores de virulência. (Artigo 1) que se encontra submetido ao periódico Journal of Food and Nutrition Research, cujo Qualis em Biodiversidade é B3 e seu fator de impacto é de 0,7.

2. Analysis by UPLC-MS-QTOF and antifungal activity of guava (*Psidium guajava* L.), aceito para publicação no periódico Food and Chemical Toxicology, com Qualis A2 em Biodiversidade e fator de impacto de 3,778.

5.1 RESULTADO 1

Atividade anti-*Candida* de *Psidium guajava* L.: composição química UPLC-MS-ESI-QTOF, inibição do crescimento, alterações na morfologia celular e fatores de virulência.

Camila Fonseca Bezerra^{1*} Janaína Esmeraldo Rocha¹ Maria Karollyna do Nascimento Silva¹ Thiago Sampaio de Freitas¹ Amanda Karine de Sousa¹ Antonia Thassya Lucas dos Santos¹ Rafael Pereira da Cruz¹ Allana Silva Rodrigues¹ Joara Nályda Pereira Carneiro¹ Antônio Linkoln Alves Borges Leal¹ Jacqueline Cosmo Andrade¹ Débora Lima Sales¹ Henrique Douglas Melo Coutinho¹ Paulo Riceli Vasconcelos Ribeiro³ Edy Sousa de Brito³ José Galberto Martins da Costa¹ Irwin Rose Alencar de Menezes¹ Waltécio de Oliveira Almeida¹ Maria Flaviana Bezerra Moraes-Braga²

* Autor para correspondência: camilawasidi@gmail.com

¹ Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri-URCA, Crato (CE), Brasil;

² Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Regional do Cariri-URCA, Crato (CE), Brasil;

³ Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais- LMQPN, Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza (CE), Brasil.

RESUMO

Psidium guajava L. é uma planta amplamente utilizada para alimentação e na medicina popular em todo o mundo. Estudos demonstraram que as folhas de goiaba possuem propriedades antifúngicas, principalmente aos fungos do gênero *Candida*. Nesse estudo foram testadas frações Flavonoídica e Tânica das folhas frescas para investigar sua composição química e o potencial antifúngico *in vitro*. Os compostos nas folhas de goiaba foram determinados por UPLC-ESI-QTOF-MS. Os resultados obtidos por análise cromatográfica permitiram encontrar 28 compostos nas duas frações das folhas de goiaba, apresentando um maior conteúdo de derivados de flavonóis e gálicos, entre estes alguns com propriedades antifúngicas. A plataforma QTOF permitiu a determinação de vários compostos fenólicos com propriedades antifúngicas. Os ensaios microbiológicos foram realizados frente à *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei* por microdiluição para determinar a IC₅₀, a curva de viabilidade celular e o efeito inibidor por meio da associação das frações ao Fluconazol. A Concentração Fungicida Mínima (CFM) foi realizada por subcultivo em meio sólido e os testes para verificar as mudanças morfológicas pela ação das frações foram realizados em câmaras de microcultivo em concentrações baseadas na microdiluição, Concentração Superior Avaliada - CSA/4, CSA e CSA x2. A IC₅₀ das frações isoladas e associadas entre si foi calculado variando entre 5,10 a 926,56 µg/mL, o valor da CFM nas frações isoladas foi de ≥ 4096 µg/mL, porém quando associadas ao FCZ frente à CK as concentrações foram reduzidas para 512 µg/mL e 1024 µg/mL, o valor do IC₅₀ das frações associadas ao fluconazol variaram entre 1,38 e 925,56 µg/mL, demonstrando que a associação do produto natural com o antifúngico apresentou um sinergismo destacado. As frações afetam a habilidade de transição morfológica, evitando a formação de hifas. As frações flavonoídica e tânica possuem um potencial antifúngico relevante, pois causaram a inibição fúngica em uso isolado e potencializou a ação do Fluconazol, reduzindo a concentração do mesmo, coibiu a disseminação de estruturas filamentosas fúngicas, o dimorfismo celular, um dos fatores de virulência, evitando a invasão de substratos. A

49 fração tânica mostrou-se em evidência com os melhores resultados dos testes, com um
50 desempenho mais significativo, no entanto todas as frações apresentaram efeito
51 sinérgico no teste de associação ao antifúngico de referência. Novos estudos serão
52 necessários para elucidar o mecanismo de ação dos produtos naturais. Estes resultados
53 destacam a espécie como fonte promissora de compostos ativos na inibição de
54 crescimento e de virulência de *Candida* spp.
55

56 Palavras-chave: *Candida*, UPLC-ESI-QTOF-MS, efeito antifúngico, Fluconazol,
57 inibição de dimorfismo, *Psidium guajava* L.

58 1. INTRODUÇÃO

59
60 As patologias causadas por
61 fungos hoje estão entre as doenças mais
62 complicadas de serem controladas em
63 seres humanos. Alguns fungos causam
64 doenças em pessoas sem problemas de
65 saúde, porém grande parte das micoses
66 atinge pacientes que já estão com um
67 quadro de doenças graves e
68 prejudicando frequentemente o sucesso
69 dos avanços médicos mais recentes no
70 tratamento do câncer, transplante de
71 órgãos sólidos e células
72 hematopoietizadas, medicamentos para
73 neonatos, tratamentos de doenças
74 autoimunes, traumas e cuidados
75 intensivos e cirurgias sofisticadas
76 (KÖHLER et al., 2015).

77 Dentre as espécies do gênero
78 *Candida*, a principal responsável pelas
79 afecções que podem atingir a pele ou a
80 mucosa (LOPEZ-MARTINEZ, 2010)
81 ou pode adentrar na corrente sanguínea
82 e dissipar para órgãos internos
83 (CALDERONE E FONZI, 2001) é
84 *Candida albicans*. Outras espécies não-
85 *albicans* emergentes, como *C.*
86 *dublinskiensis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e
87 *C. krusei* também foram associadas
88 candidíase invasiva (MICELI, DIAZ E
89 LEE, 2011)

90 A candidíase é a patologia
91 fúngica mais prevalente que atinge
92 humanos e o foco do problema é que ela
93 está associada a uma taxa de
94 mortalidade de 10-49% em pacientes
95 imunocomprometidos (PFALLER E
96 DIEKEMA, 2007).

97 A resistência aos antifúngicos
98 atuais tornou-se um embate e a eficácia
99 clínica destes fármacos vem sendo
100 ameaçada pelo surgimento de espécies
101 resistentes a múltiplos medicamentos
102 (PAUL E MOYE-ROWLEY, 2014). Os
103 azóis são os fármacos antifúngicos de
104 primeira linha para o tratamento de
105 candidíase (CHEN et al., 2008).

106 Fungos do gênero *Candida* são
107 bastante comuns, uma vez que fazem
108 parte da microbiota normal do
109 organismo humano e podem ser
110 isolados nos mais diversos sítios
111 anatômicos; na boca, por exemplo,
112 cerca de 20 a 50% dos dentados
113 saudáveis apresentam colonização por
114 *Candida* spp. (ZOMORODIAN et al.,
115 2011).

116 O gênero *Psidium* possui uma
117 série de atividades biológicas
118 comprovadas *in vitro* e *in vivo*, entre as
119 quais, o efeito antifúngico
120 (CAMACHO-HERNÁNDEZ et al.,
121 2004; LAPENNA et al., 2003;
122 SUWANMANEE; KITISIN;

123 LUPLERTLOP et al., 2014; WEN et al., 156 antifúngica. O objetivo desse estudo foi
124 2011). Dentre as espécies do gênero, 157 investigar a composição química e o
125 *Psidium guajava* L. possui valor 158 efeito *in vitro* das frações de folhas
126 etnomedicinal, onde é conhecida por 159 frescas de *P. guajava* L. isoladas,
127 sua versatilidade terapêutica, sendo 160 combinadas entre si e com o fluconazol
128 utilizada entre outras coisas para o 161 na inibição do crescimento e do fator de
129 tratamento de sintomas associados às 162 virulência das leveduras de *Candida*
130 infecções causadas por *Candida* spp. 163 spp.

131 (MORAIS-BRAGA et al., 2015, 2016) 164

132 Os produtos naturais oriundos 165
133 das plantas são relatados por ser uma 166
134 fonte rica de diversos compostos que 167
135 podem servir como base para o modelo 168
136 racional da droga (KSOURI et al; ZIDA 169
137 et al., 2017). 170

138 Pesquisas têm sido realizadas no 171
139 sentido de promover a combinação de 172
140 fármacos comerciais, para os quais já 173
141 tenha sido verificado o fenômeno da 174
142 resistência, com produtos naturais na 175
143 forma de extrato, frações, óleos 176
144 essenciais ou constituintes isolados, 177
145 numa tentativa de driblar a resistência 178
146 de *Candida* spp. (CALIXTO JÚNIOR 179
147 et al., 2015; REKHA e VIDYASAGAR, 180
148 2013; SINGH et al., 2013). 181

149 Pesquisadores estão cada vez 182
150 mais voltando sua atenção para o estudo 183

151 com produtos naturais, em busca do 184
152 desenvolvimento de fármacos mais 185

153 seguros, menos tóxicos, com um taxa de 186
154 efeitos colaterais reduzida e prontos 187
155 para superar a ameaça de resistência 188

2. METODOLOGIA

2.1 Área de coleta

O material vegetal foi coletado em área rural no município de Crato, sul do Ceará, Brasil (425m, 07°14',18" de latitude Sul e 39°23',37" de longitude West de Greenwich). O período de coleta foi feito entre as 8:30 h e as 10:30 h da manhã no mês de março/2017. Do material coletado foi produzida uma exsicata que posteriormente foi depositada no Herbário Caririense Dárdano de Andrade-Lima (HCDAL) da Universidade Regional do Cariri – URCA, identificada e registrada sob o número 13.222.

2.2 Material vegetal

O estudo foi realizado utilizando folhas jovens e saudáveis de *Psidium guajava* L., conhecida localmente como goiaba, sem indicativo

189 de contaminação por parasitas. Para 222 obtido anteriormente, foi adicionado
190 obtenção das frações utilizamos folhas 223 100 mL de clorofórmio, levado ao
191 frescas, sendo as mesmas 224 banho ultrassônico por dez minutos,
192 posteriormente trituradas em pequenas 225 seguindo os mesmos passos anteriores.
193 partes para obtenção das frações. 226 Na ultima fase adicionamos 50 mL de
194

195 **2.3 Extração da Fração Tânica**

196 Para a preparação da Fração 229
197 Tânica 20 g das folhas trituradas foram 230
198 misturadas com 50 mL da solução 231
199 acetona/água (7:3), posteriormente 232
200 colocada durante 30 minutos em banho 233
201 ultrassom a 5°C. O resíduo foi filtrado e 234
202 o procedimento foi repetido por mais 235
203 duas vezes. As fases líquidas foram 236
204 juntas e levadas para rotaevaporador 237
205 para retirada da acetona. A fase aquosa 238
206 foi particionada com 50 mL de Éter de 239
207 Petróleo, por três vezes, após isso a 240
208 amostra foi congelada e posteriormente 241
209 liofilizada (TERRILL et al., 1992). 242

211 **2.4 Extração da Fração Flavonoídica**

212 Para a extração da Fração 245
213 Flavonoídica utilizamos 10 g do 246
214 material vegetal adicionamos 100 mL 247
215 de hexano (P.A), com auxílio do banho 248
216 ultrassom, aquecendo a 5 °C, por dez 249
217 minutos e em seguida levamos à 250
218 centrífuga (3.000 rpm) por dez minutos. 251
219 O material foi filtrado e os 252
220 procedimentos foram repetidos por mais 253
221 duas vezes. Em seguida ao resíduo 254

222 obtido anteriormente, foi adicionado
223 100 mL de clorofórmio, levado ao
224 banho ultrassônico por dez minutos,
225 seguindo os mesmos passos anteriores.
226 Na ultima fase adicionamos 50 mL de
227 acetato de etila, posteriormente levado
228 ao evaporador rotativo (BARBOSA,
229 2004).

230 **2.5 Identificação de compostos por** 231 **cromatografia líquida de** 232 **ultraeficiência acoplada a sistema de** 233 **quadrupolo/tempo de voo (UPLC-** 234 **QTOF)**

235 A identificação dos compostos
236 presentes nas frações foi realizada em
237 sistema Acquity® UPLC acoplado a um
238 sistema de Quadrupolo/Tempo de Voo
239 (QTOF) (Waters Corporation, Milford,
240 EUA), no Laboratório de Química e
241 Produtos Naturais, Embrapa
242 Agroindústria Tropical (Fortaleza,
243 Ceará). As corridas cromatográficas
244 foram realizadas em coluna Waters
245 Acquity® UPLC BEH (150 x 2,1 mm;
246 1,7 µm), temperatura fixa de 40 °C,
247 fases móveis água com 0,1% de ácido
248 fórmico (A) e acetonitrila com 0,1% de
249 ácido fórmico (B), gradiente variando
250 de 2% a 95% B (15 min), fluxo de 0,4
251 mL/min e volume de injeção de 5 µl. O
252 modo ESI foi obtido na faixa de 110-
253 1180 Da, temperatura da fonte fixa a
254 120 °C, temperatura de dessolvatação de

255 350 °C, fluxo do gás dessolvatação de 288 Dextrose (SDB, HIMEDIA),
256 500 L/h, cone de extração de 0,5 V, 289 duplamente concentrado foi utilizado
257 voltagem capilar de 2,6 kV. O modo 290 nos testes de microdiluição. Na análise
258 ESI+ foi adquirido na faixa de 110-1180 291 micromorfológica foi usado o Potato
259 Da, temperatura da fonte fixa de 120°C, 292 Dextrose Agar (PDA) empobrecido
260 temperatura de dessolvatação de 350 °C, 293 acrescido de ágar bacteriológico.
261 fluxo do gás dessolvatação de 500 L/h e 294
262 voltagem do capilar de 3,2 kV. Leucina 295 **2.6.2 Drogas, reagentes e preparação**
263 encefalina foi utilizada como lock mass. 296 **de soluções**
264 O modo de aquisição foi MSE 297 O dimetil sulfóxido (DMSO,
265 (espectrometria de massas de alta 298 Merck, Darmstadt, Alemanha) foi
266 energia). O instrumento foi controlado 299 utilizado para a diluição das frações, e o
267 pelo software Masslynx® 4.1 (Waters 300 fluconazol antifúngico (Cápsula – Prati
268 Corporation, Milford, EUA). 301 donaduzzi), diluído em água, foi
269 **2.6 Ensaios antifúngico** 302 utilizado como medicamento de
270 **2.6.1 Cepas e meios de cultura** 303 referência. A solução do produto foi
271 As cepas utilizadas foram do 304 preparada pesando 0,05 g das frações e
272 tipo padrão obtidas da Coleção de 305 depois diluímos em 1 mL de DMSO.
273 Cultura Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) do 306 Para obter a concentração desejada para
274 Instituto Brasileiro de Controle de 307 o teste, as frações foram ainda diluídas
275 Qualidade em Saúde (INCQS), sendo 308 em água destilada estéril (4.096 µg/mL)
276 elas *Candida albicans* 40006, *Candida* 309 de modo que a concentração de DMSO
277 *tropicalis* 40042 e *Candida krusei* 310 não exercesse qualquer atividade nas
278 40095. As estirpes foram inoculadas em 311 células dos testes (STOPPA et al.,
279 Sabouraud Dextrose Agar (SDA, 312 2009).
280 KASVI) e incubadas durante 24h a 37° 313 **2.6.3 Determinação da IC₅₀ e**
281 C. Posteriormente, alíquotas de levedura 314 **obtenção da curva de viabilidade**
282 foram transferidas para tubos de ensaio 315 **celular**
283 contendo cada um 3 mL de solução de 316 Nesse teste utilizamos as
284 Cloreto de Sódio estéril (0,9%). A 317 frações isoladas e combinadas entre si
285 concentração do inóculo foi 318 através do método de microdiluição em
286 padronizada comparando-se à escala 0.5 319 caldo em placas de 96 poços. Cada poço
287 de McFarland. O Caldo Sabouraud 320 foi preenchido com 100 µL de CSD

321 contendo 10% de inóculo fúngico e, em 354 uma placa de Petri contendo SDA, com
322 seguida, foram adicionados 100 µL do 355 auxílio de uma cartela guia fixada no
323 produto natural (4.096 µg/mL) ou 356 fundo da placa para a subcultura de
324 fluconazol (referência antifúngica) na 357 levedura. Após 24 h de incubação, as
325 mesma concentração, ao primeiro poço 358 placas foram inspecionadas para
326 seguido a diluição em série. As 359 qualquer formação de colônias de
327 concentrações nos poços variaram de 2 360 *Candida* (ERNST et al., 1999, com
328 a 2048 µg/mL. O último poço foi 361 modificações). A concentração em que
329 utilizado como controle de crescimento 362 não houve crescimento de colônias de
330 (JAVADPOUR et al., 1996). Foram 363 fungos foi considerada a CFM do
331 também preparados controles para o 364 produto natural.

332 diluente dos produtos (com solução de 365 **2.6.4 Avaliação do efeito modificador**
333 Cloreto de sódio 0,9% no lugar do 366 **da ação do Fluconazol**
334 inóculo) e controle de esterilidade do 367
335 meio. Todos os testes foram realizados 368 Inicialmente foi verificada a
336 em quadruplicata. As placas foram 369 ação das frações e do fluconazol,
337 incubadas a 37 °C durante 24 h e 370 individualmente sob o crescimento de
338 posteriormente lidas num 371 leveduras. E neste teste foi avaliado o
339 espectrofotômetro ELISA 372 efeito das frações isoladas e
340 (Thermoplate®) a um comprimento de 373 combinação das frações com a droga de
341 onda de 630 nm. Os resultados obtidos 374 referência, para constatar se houve ou
342 na leitura ELISA foram utilizados para 375 não potencialização da ação do
343 construir a curva de viabilidade celular 376 antifúngico pelas frações. Para tanto,
344 e a IC₅₀ das frações (MORAIS-BRAGA 377 utilizou-se o produto natural em
345 et al., 2016). 378 concentração subinibitória (CFM/16),
379 de acordo com a metodologia utilizada
380 por Coutinho et al. (2008 modificado).

346 **2.6.3 Determinação da Concentração** 347 **Fungicida Mínima (CFM)**

348 Para este teste, a ponta de uma 381 antifúngico, o efeito verificado é
349 haste estéril foi inserida em cada poço 382 considerado do tipo sinérgico, caso
350 da placa do teste de microdiluição após 383 prejudicasse a atuação deste, ficaria
351 a incubação de 24 h (exceto no controle 384 constatado um efeito antagônico. As
352 de esterilidade). Depois de misturar o 385 placas foram preenchidas com 100 µL
353 meio em cada poço, a haste foi levada a 386 de meio + inóculo + fração e em

387 seguida microdiluídas com 100 µL do 420 colocadas na incubadora durante 24 h
388 fluconazol na concentração de 4.096 421 (37°C) e inspecionadas e registradas por
389 µg/mL foi adicionado em cada primeiro 422 um microscópio óptico (AXIO
390 poço da coluna, para que sofresse 423 IMAGER M2-3525001980- ZEISS-
391 diluição seriada em concentrações que 424 Alemanha) de luz usando uma objetiva
392 variaram de 2 a 2048 µg/mL. As placas 425 20X. Foi realizado um controle para o
393 foram incubadas a uma temperatura de 426 crescimento de levedura (hifas
394 37 °C por 24 horas. A leitura foi 427 estimuladas em meio carente de
395 realizada em aparelho de 428 nutrientes), bem como um controle com
396 espectrofotometria de ELISA 429 o fluconazol antifúngico convencional
397 (Thermoplate®). 430 para fins comparativos. Os ensaios

398 **2.6.5 Efeito das frações e do** 431 foram realizados de acordo com Sidrin e
399 **fluconazol na morfologia fúngica** 432 Rocha (2010) e Mendes (2011), com
400 Para determinar se as frações 433 modificações no que diz respeito a
401 individualmente e combinadas 434 concentrações e meio utilizados.

402 causaram alterações na morfologia 435 **2.6.6 Mensuração da extensão das**
403 fúngica, ao inibir a expressão de 436 **hifas**

404 transição morfológica, considerado um 437 A partir do software Zen foi
405 importante fator de virulência fúngica. 438 possível mensurar as extensões
406 Câmaras úmidas estéreis para 439 atingidas pelas hifas e os valores de
407 microcultivos foram preparadas para 440 redução após ação das frações. Foram
408 observação das leveduras. Três 441 retiradas cinco fotos de cada lâmina por
409 mililitros de meio de PDA empobrecido 442 concentração e de cada foto foram
410 por diluição foram vertidos sob a 443 escolhidas aleatoriamente dez hifas a
411 lâmina, contendo a Concentração 444 serem medidas, após isso foi realizado a
412 Superior Avaliada - CSA x2 445 média aritmética do comprimento de
413 (4096µg/mL), CSA (2048 µg/mL) e 446 cada lâmina e no final as médias foram
414 CSA/4 (512µg/mL). Alíquotas dos 447 compiladas.

415 subcultivos foram retiradas das placas 448
416 de Petri para fazer duas estrias paralelas 449 **2.7 Análise Estatística**

417 no meio sólido (PDA), que foram 450 Os dados obtidos foram
418 posteriormente cobertas com uma 451 verificados quanto à sua distribuição
419 lamínula estéril. As câmaras foram 452 normal e depois analisados por

453 ANOVA de duas vias ($P < 0.05$;
454 $*P < 0.1$; $****P < 0.0001$), comparando
455 os valores para cada concentração do
456 extrato, ponto a ponto, com o teste post
457 hoc de Bonferroni. Os valores de IC_{50}
458 foram obtidos por regressão não linear
459 com interpolação de incógnitas de
460 curvas padrão obtidas a partir dos
461 valores do crescimento fúngico em
462 função da concentração do extrato e
463 expressos em $\mu\text{g/mL}$.

464 Para a análise estatística, foi
465 utilizado o software Graphpad Prism, v.
466 5.0.

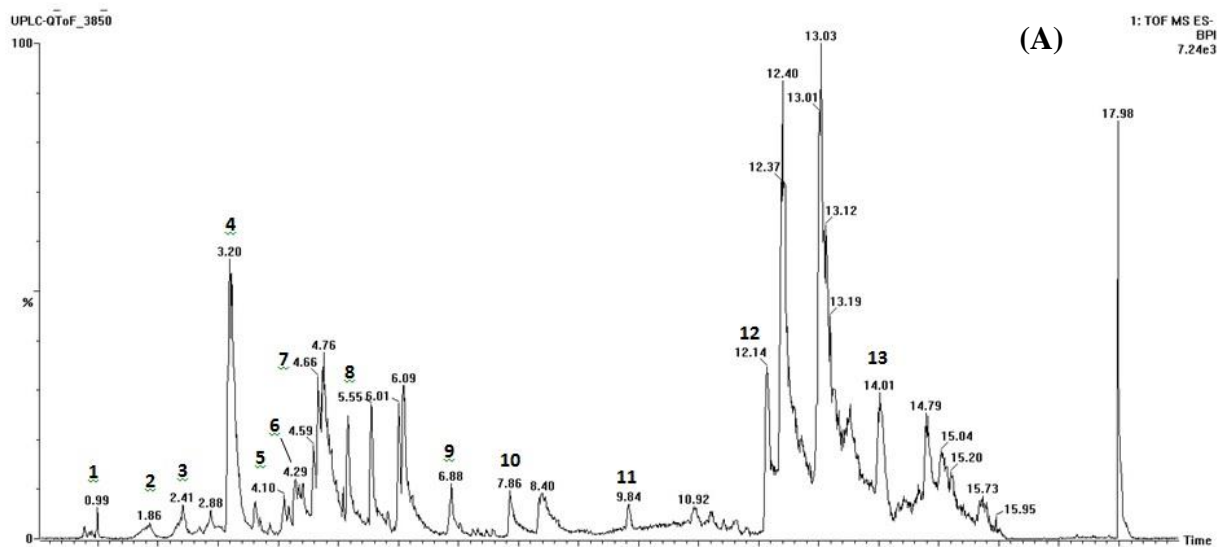
467

468 **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO:**

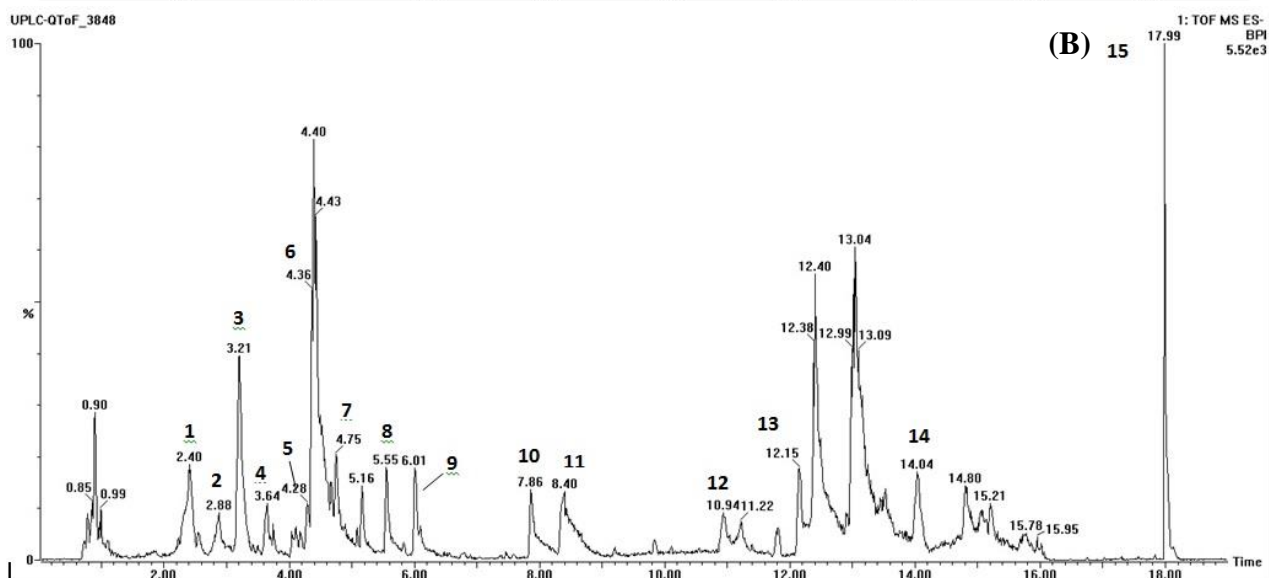
469 **3.1 Identificação de constituintes** 470 **químicos- UPLC-ESI-QTOF-MS**

471 A identificação dos
472 componentes foi realizada com base nos
473 dados fornecidos pelo programa
474 utilizado, como os seus tempos de
475 retenção, espectros de massa,
476 juntamente com as informações citadas
477 anteriormente na literatura. As Tabelas
478 1 e 2 resumem a informação sobre
479 identificação: tempos de retenção,
480 massa (m/z) do experimento e
481 calculado, fragmentos (MS/MS),
482 fórmula molecular e erro (ppm).

483



484



485 **Figura 1.** Cromatografia líquida de ultra-desempenho com cromatogramas de espectrometria de massa de
486 alta definição (UPLC-MS) de Fração Flavonoídica de Folhas Frescas de *Psidium guajava* (A) e Fração
487 Tânica de Folhas Frescas de *Psidium guajava* (B) no modo iônico negativo. Time: Tempo de retenção em
488 minutos.

489

490

491

492 **Tabela 1:** UPLC-ESI-QTOF-MS- identificação de constituintes químicos da Fração Flavonoídica de Folhas Frescas de *Psidium guajava* (A)

Peak no.	Rt min	[M-H] ⁻ Observed	[M-H] ⁻ Calculated	Product Ions (MS/MS)	Empirical Formula	Ppm (error)	Putative Name	Referências
1	0.98	481,0619	481,0618	300,9985, 275,0188,	C ₂₀ H ₁₇ O ₁₄	0.2	HHDP glucose Isomer 1	(Díaz-de-Cerio et al., 2016)
2	1.865	169,0134	169,0137	125,0261	C ₇ H ₅ O ₅	1.8	Ácido Gálico	(Díaz-de-Cerio et al., 2016)
3	2.421	305,0668	305,0661	219,0637, 125,0252,	C ₁₅ H ₁₃ O ₇	2.3	Galocatequina	(Díaz-de-Cerio et al., 2016)
4	3,197	289,0708	289,0712	245,0794, 203,0695, 125,0243,	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	1.4	Catequina	(Díaz-de-Cerio et al., 2016)
5	4.08	615,0989	615,0986	463,0887, 300,0231	C ₂₈ H ₂₃ O ₁₆	0.5	Quercetin-galloylhexoside Isomer	(Díaz-de-Cerio et al., 2016)
6	4,292	300,9936	300,9984	229,0529	C ₁₄ H ₆ O ₈	2.0	Ellagic acid	(Díaz-de-Cerio et al., 2016)
7	4,665	433,0745	433,0771	301,0316	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	6.0	Reynoutrin	(Díaz-de-Cerio et al., 2016)
8	5.557	571,1429	571,1452	313,0545, 257,0827, 169,0134	C ₂₈ H ₂₇ O ₁₃	4.0	Guavinoside B	(Díaz-de-Cerio et al., 2016)
9	6.889	327,2157	327,2171	328,2348	C ₁₈ H ₃₁ O ₅	4.3	9(S),12(S),13(S)-Trihydroxy-10 (E),15(Z)-octadecadienoic acid	(Cao et al., 2014)
10	7.860	501,3207	501,3216	473,2345, 301,0359, 269,0527	C ₃₀ H ₄₅ O ₆	1.8	Não identificado	
11	9.839	271,0590	271,0606	—	C ₁₅ H ₁₁ O ₅	5.9	Naringenina	(Díaz-de-Cerio et al., 2016)

								et al., 2016)
12	12.138	491,2369	491,2375	—	C ₃₇ H ₃₁ O	1.2	Não identificado	
13	14,010	489,2210	489,2218	—	C ₃₇ H ₂₉ O	1.6	Não identificado	

493 Os compostos foram identificados tentativamente de acordo com os espectros de massa e os dados correspondentes da literatura. Peak no.: Número do pico, Rt min: Tempo de
494 retenção em minutos, [M-H]⁻ Observed: Massa observada no experimento, [M-H]⁻ Calculated: Massa calculada pelo software, Product Ions: Produto iônico, Ppm: , Putative
495 name: Possível nome.

496

497 **Tabela 2:** UPLC-ESI-QTOF-MS- identificação de constituintes químicos da Fração Tânica de Folhas Frescas de *Psidium guajava* (B)

Peak no.	Rt min	[M-H] ⁻ Observed	[M-H] ⁻ Calculated	Product Ions (MS/MS)	Empirical Formula	Ppm (error)	Putative Name	Referências
1	2,430	305,0648	305,0661	219,0654, 125,0249	C ₁₅ H ₁₃ O ₇	4.3	Galocatequina	(Díaz-de-Cerio et al., 2016)
2	2,877	577,1357	577,1346	425,0906, 407,0778, 289,0704, 125,0241	C ₃₀ H ₂₅ O ₁₂	1.9	Procianidina B Isomer	(Díaz-de-Cerio et al., 2016)
3	3,205	289,0642	289,0653	245,0822	C ₂₂ H ₉ O	3.8	Não identificado	
4	3,645	305,0674	305,0661	125,0254	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	4.3	Galocatequina isômero	(Díaz-de-Cerio et al., 2016)
5	4,292	300,9954	300,9984	229,0248	C ₁₄ H ₆ O ₈	10	Ácido Elágico	(Díaz-de-Cerio et al., 2016)
6	4,387	301,0354	301,0348	178,9975, 151,0005	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	2.0	Quercetina	(Díaz-de-Cerio et al., 2016)
7	4,657	433,0763	433,0771	301,0292	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	1.8	Reynoutrin (Quercetin-3D-O-xilosideo)	(Díaz-de-Cerio et al., 2016)

8	5,558	571,1442	571,1452	313,0542, 257,0785, 169,0122	C ₂₈ H ₂₈ O ₁₃	1.8	Guavinoside B	(Díaz-de-Cerio et al., 2016)
9	6,005	557,1273	557,1295	313,0570, 243,0655, 169,0142	C ₂₇ H ₂₆ O ₁₃	3.9	2,6-dihydroxy-3-methyl-4-O-(6"-O-galloyl-β-D-glucopyranosyl)-benzophenone	(Díaz-de-Cerio et al., 2016)
10	7,860	501,3194	501,3216	—	C ₃₀ H ₄₆ O ₆	4.4	Não identificado	
11	8,400	503,3365	503,3373	—	C ₃₀ H ₄₈ O ₆	1.6	Não identificado	
12	10,935	633,3801	633,3791	—	C ₃₉ H ₅₄ O ₇	1.6	Não identificado	
13	12,175	491,2419	491,2434	—	C ₃₀ H ₃₆ O ₆	3.1	Não identificado	
14	14,063	489,2255	489,2277	—	C ₃₀ H ₃₄ O ₆	4.5	Não identificado	
15	17,980	473,2328	473,2328	—	C ₃₀ H ₃₄ O ₅	6.1	Não identificado	

498 Os compostos foram identificados tentativamente de acordo com os espectros de massa e os dados correspondentes da literatura. Peak no.: Número do pico, Rt min: Tempo de
499 retenção em minutos, [M-H]⁺ Observed: Massa observada no experimento, [M-H]⁺ Calculated: Massa calculada pelo software, Product Ions: Produto iônico, Ppm: , Putative
500 name: Possível nome.

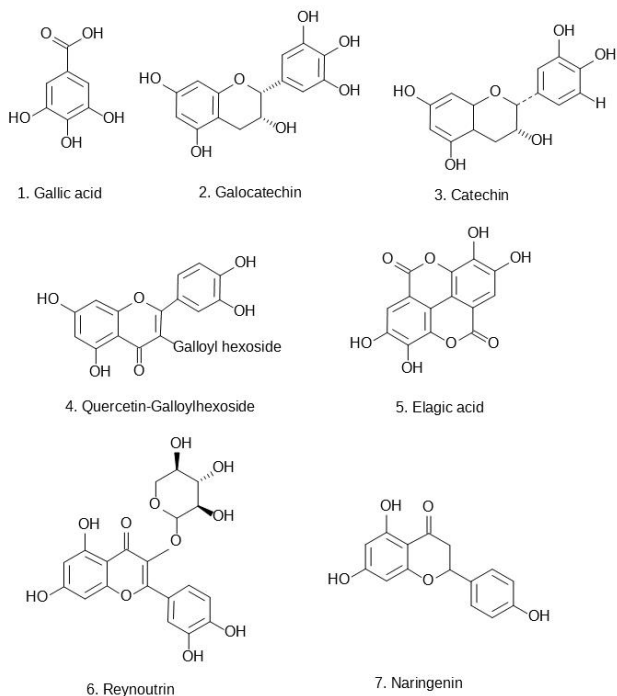
501

502 A partir das análises química das 534 nas duas frações a presença dos
503 frações podemos observar na Tabela 1 535 compostos fenólicos.
504 na qual constam os resultados da Fração 536 Miricetina, catequina, ácido
505 Flavonoídica de Folhas Frescas de *P.* 537 gálico e elágico e seus derivados
506 *guajava* L. onde foram encontrados 13 538 (CHANG et al., 2013), catequina,
507 compostos, destes sendo três 539 epicatequina, rutina, naringenina e
508 flavonoides (Quercetina- 540 kaempferol (CHEN et al., 2010) outros
509 galloylhexoside Isômero, Reynoutrin e 541 flavonoides, como a naringenina,
510 Narigerina), quatro taninos hidrolisáveis 542 flavonas e flavonol, incluindo o
511 (HHDP glucose Isomer 1, Ácido 543 kaemferol, o morin e a quercetina,
512 Gálico, Ácido elágico e Guavinoside 544 fazem parte de um extenso grupo de
513 B), dois taninos condensados 545 metabólitos secundários dos vegetais
514 (Galocatequina e Catequina), um 546 que têm sido descritos como tendo
515 alcaloide (9(S),12(S),13(S)-Trihydroxy- 547 atividades antimicrobianas (RAUHA et
516 10 (E),15(Z)-octadecadienoic acid), os 548 al., 2000), corroborando com o nosso
517 outros compostos não foram possíveis 549 estudo onde também encontramos
518 de ser identificados. 550 alguns desses compostos como podem

519 Na Tabela 2 temos a composição 551 ser vistos nas Tabelas 1 e 2.
520 química da Fração Tânica de Folhas 552 Um dos grupos mais numerosos
521 Frescas de *P. guajava* onde foram 553 e representativos de substâncias
522 encontrados 15 compostos, destes oito 554 bioativas são os compostos fenólicos
523 foram possíveis de ser identificados que 555 que estão presentes em grande parte das
524 são: quatro flavonoides (Procianidina B 556 frutas e vegetais utilizados para
525 isômero, Quercetina, Reynoutrin 557 consumo da população (SOTO-VACA,
526 (Quercetin- 3D-O-xilosideo) e 2,6- 558 2012).
527 dihydroxy-3-methyl-4- O-(6"-O-
528 galloyl- β -D- glucopyranosyl)-
529 benzophenone), dois taninos
530 condensados (Galocatequina e
531 Galocatequina isômero) e dois taninos
532 hidrolisáveis (Ácido elágico e
533 Guavinoside B), predominantemente

559

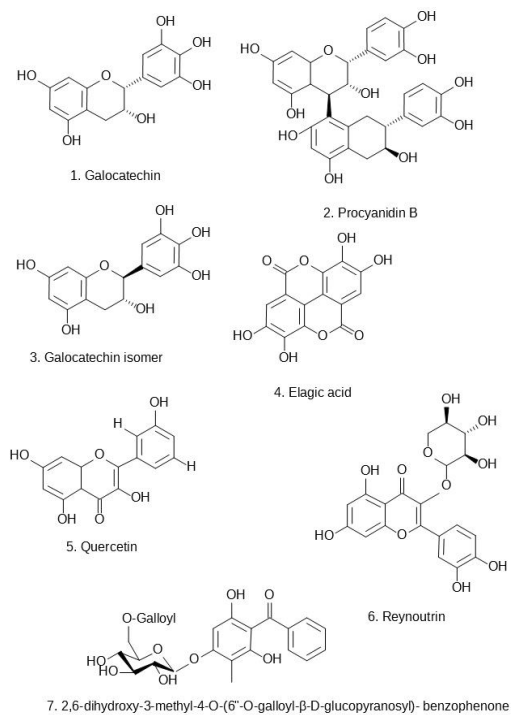
560 **Figura 2:** Principais estruturas correspondentes aos compostos identificados na
561 Fração Flavonoídica de Folhas Frescas de *Psidium guajava* L.



562

563

564 **Figura 3:** Principais estruturas correspondentes aos compostos identificados na
565 Fração Tânica de Folhas Frescas de *Psidium guajava* L.



566

567 No estudo de Scherer & Godoy 599 **3.2 Inibição de crescimento- Curva de**
568 (2014) ao avaliar as extrações com 600 **viabilidade celular e IC₅₀**
569 solventes de diferentes polaridades 601 A Tabela 3 mostra a IC₅₀ das
570 perceberam que os solventes de acetato 602 Frações Flavonoídica e Tânica de folhas
571 de etila e clorofórmio/diclorometano 603 frescas de *P. guajava* L. testadas de
572 (1:1) mostraram menor capacidade de 604 forma isolada e em combinação entre si,
573 extração de compostos fenólicos, com 605 além do efeito do Fluconazol como
574 os valores mais baixos para todos os 606 antifúngico de controle frente a
575 compostos, podendo esse fato estar 607 diferentes espécies de *Candida*. Os
576 associado a menor solubilidade de 608 valores variaram entre 102,2 a
577 compostos fenólicos em solventes de 609 1130,37µg/mL. A fração Flavonoídica
578 baixa polaridade. 610 apresentou atividade frente as três cepas
579 Além disso, em seu trabalho 611 testadas, porém em concentrações
580 foram encontradas outras substâncias de 612 superiores ao controle Fluconazol,
581 outras classes, diferentes de compostos 613 sendo o menor valor para CA 40006
582 fenólicos como eram esperados, foram 614 com uma IC₅₀ de 744,30 µg/mL.
583 identificadas pelo método LC-ESI-MS- 615 A fração tânica isolada
584 MS-TOF, método semelhante ao nosso 616 apresentou uma significativa inibição
585 e seu estudo corrobora com o nosso, 617 frente às duas primeiras cepas testadas,
586 visto que os extratores utilizados 618 inclusive melhor que o controle,
587 selecionaram, em geral compostos 619 obtendo o menor valor do teste com
588 fenólicos, sendo possível o encontro 620 uma IC₅₀ de 105,10 µg/mL para CA
589 destes em ambas frações no presente 621 40006, evidenciando seu potencial
590 estudo. 622 inibidor. A associação das frações foi
591 Flores et al. (2013) em seu 623 menos eficaz que a fração tânica isolada
592 estudo com frações da espécie *Psidium* 624 frente a CA e CT, sugerindo um
593 *friedrichsthalianum* conseguiu 625 antagonismo, no entanto os valores das
594 identificar componentes como ácido 626 concentrações foram menores que o
595 elágico, miricetina, quercitrina e 627 antifúngico sistêmico e mostrou um
596 quercetina, respectivamente. 628 sinergismo com o menor valor de 102, 2
597 629 µg/mL para CK 40095, em relação à
598 630 fração tânica isolada.

631

632

633 **Tabela 3:** IC₅₀ (µg/mL) das Frações Flavonoídica e Tânica de Folhas Frescas de *P.*
634 *guajava* frente a linhagens de *Candida*.

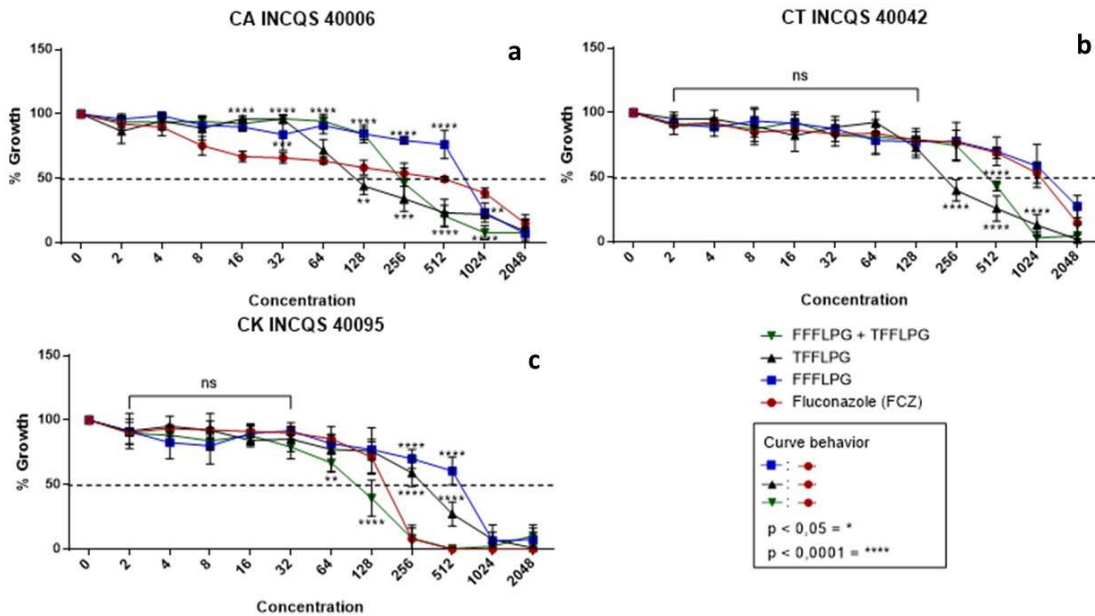
Strains	FCZ	FFFLPG	TFFFLPG	FFFLPG + TFFFLPG
CA INCQS 40006	378,8	744,3	105,1	241,8
CT INCQS 40042	925,56	1130,37	236,4	481,9
CK INCQS 40095	163,0	599,0	385,9	102,2

635 FCZ: Fluconazol, FFLPG: Fração Flavonoídica de Folhas Frescas de *Psidium guajava*, TFFFLPG: Fração
636 Tânica de Folhas Frescas de *Psidium guajava*; CA: *Candida albicans*; CT: *Candida tropicalis*; CK:
637 *Candida krusei*; INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.
638

639 Analisando a curva de
640 viabilidade celular dos fungos em
641 relação às frações e ao FCZ em suas
642 diferentes concentrações (Figura 4.a)
643 frente a CA 40006, percebe-se que a
644 fração flavonoídica apresentou
645 isoladamente uma elevação de sua
646 concentração, sendo este fato
647 estatisticamente relevante diante do
648 fluconazol nas concentrações de 16 a
649 512 µg/mL.

650 A fração tânica frente a CA
651 40006 inicialmente não demonstrou
652 uma ação eficaz nas concentrações de
653 16 e 32 µg/mL (Figura 4.a),no entanto
654 com o aumento da concentração houve
655 melhora do potencial de inibição nas
656 concentrações de 128 a 1024 µg/mL.
657 No que se refere à associação, as
658 mesmas atuaram sinergicamente nas
659 concentrações de 512 e 1024 µg/mL.

660 **Figura 4:** Efeito antifúngico das Frações Flavonoídica e Tânica de Folhas Frescas de
 661 *P. guajava* individuais e associadas entre si e do Fluconazol como controle frente a
 662 linhagens de *Candida*.



663
 664 FCZ: Fluconazol, FFFLPG: Fração Flavonoídica de Folhas Frescas de *Psidium guajava* L., TFFLPG:
 665 Fração Tânica de Folhas Frescas de *Psidium guajava*; CA: *Candida albicans*; CT: *Candida tropicalis*;
 666 CK: *Candida krusei*; INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. p < 0,05; *(p < 0,1)
 667 quando comparado com o controle, ns: não significante, Concentration em µg/mL.
 668
 669

670 Na Figura 4.b mostra a ação dos 703 medicinais antiespasmódicas e
671 compostos frente à CT 40042, percebe- 704 antimicrobianas no tratamento de
672 se que a fração FFDLPG isoladamente 705 enterites, podendo também demonstrar
673 não demonstrou um efeito positivo de 706 outras bioatividades (GUTIÉRREZ,
674 inibição, agiu antagonicamente ao 707 MITCHELL E SOLIS, 2008).
675 controle nas concentrações de 1024 e 708
676 2048 µg/mL. A TFDLPG apresentou 709 para o tratamento de afecções bucais,
677 uma relevante inibição nas 710 onde as folhas como casca são usadas
678 concentrações de 256 a 1024 µg/mL, 711 na preparação de chás para serem
679 sendo mais efetivo que o fluconazol. As 712 engolidas ou abatidas ainda quentes,
680 frações juntas tiveram uma ação 713 com pretensões para combater aftas, que
681 sinérgica nas concentrações de 256 a 714 pode ser causada por cepas de *Candida*
682 1024 µg/mL. 715 (BORBA & MACEDO, 2006;

683 A ação dos compostos frente à 716 OLIVEIRA et al., 2010). Além disso,
684 CK 40095 na Figura 4.c é possível 717 existem registros de que várias partes da
685 perceber resultados que se assemelham, 718 planta são usadas não só para tratar a
686 a FFDLPG apresentou novamente uma 719 candidíase, mas também para tratar
687 atividade fraca de inibição com 720 leucorreia (FENNER et al., 2006), um
688 antagonismo nos valores de 256 a 1024 721 dos sintomas da candidíase vaginal. Na
689 µg/mL. A TFDLPG demonstrou ação 722 África do Sul, o chá das folhas e raízes
690 inversa em relação ao FCZ na 723 da goiaba é preparado para o tratamento
691 concentração de 256 µg/mL, contudo a 724 de doenças sexualmente transmissíveis
692 associação das frações obtiveram uma 725 não específicas (VAN VUUREN &
693 atividade significativa na concentração 726 NAIDOO, 2010).

694 de 128 µg/mL, sendo estatisticamente 727 Essa espécie também pode ser
695 relevante em relação ao Fluconazol, 728 encontrada em listas nacionais de
696 atingindo total inibição do crescimento 729 plantas medicinais em alguns países e é
697 em 512 µg/mL, valor clinicamente 730 utilizada em programas de políticas
698 relevante para um futuro fármaco como 731 públicas voltados para a atenção
699 terapia alternativa para tratamentos de 732 primária à saúde, como ocorre, por
700 infecções fúngicas. 733 exemplo, no Brasil (BRASIL, 2009;

701 *P. guajava* é principalmente 734 RENISUS, 2009).
702 conhecida por suas atividades

735 Morais-Braga et al. (2015) 768 significativa da concentração em todas
736 avaliou a ação de extratos de *P. guajava* 769 as linhagens testadas, comparado com o
737 frente a *C. albicans* e *C. tropicalis* 770 controle.
738 tendo como resultado MIC dos produtos 771 O menor valor da e produto
739 neste estudo foi determinada como 8192 772 natural, foi de 4,78 µg/mL frente a CA.
740 µg/mL na qual foi observada uma 773 Em relação à TFFLPG + FCZ, neste
741 redução acentuada na porcentagem de 774 teste esta união de substâncias foi a que
742 microrganismos viáveis. Os resultados 775 exibiu um notável resultado, com um
743 da Concentração Fungicida Mínima 776 efeito sinérgico frente a todas as
744 mostraram que, as concentrações 777 linhagens, visto que as concentrações
745 testadas, nenhum extrato apresentou 778 reduziram destacadamente, com o
746 efeito fungicida, já que não conseguiu 779 menor valor do teste encontrado frente à
747 remover. No caso o efeito antifúngico 780 CK com uma IC₅₀ de 1,38 µg/mL. Outro
748 observado foi fungistático, uma vez que 781 fato que se evidencia são os valores das
749 a Concentração Fungicida Mínima foi > 782 concentrações da Fração Tânica + FCZ
750 8192 µg / mL. 783 frente a CA e CT em comparação com o
751 784 FCZ isolado onde, respectivamente

752 **3.3 Efeito da associação das frações** 785 reduziram a concentração em 175 e 426
753 **individuais, associadas entre si em** 786 vezes, sendo esta a associação mais
754 **combinação com Fluconazol: Inibição** 787 eficaz do teste. Do teste um fator
755 **de crescimento- Curva de viabilidade** 788 relevante em relação a possível
756 **celular e IC₅₀** 789 diminuição da toxicidade da droga e

757 Na Tabela 4 podemos observar a 790 redução dos efeitos colaterais
758 atividade das frações em junção com o 791 comumente causados pelos antifúngicos
759 antifúngico FCZ, por meio da IC₅₀ das 792 sistêmicos.

760 Frações Flavonoídica e Tânica de 793 As FFFLPG + TFFLPG + FCZ
761 Folhas Frescas de *P. guajava* L. testadas 794 apresentaram um resultado com
762 combinação ao Fluconazol frente 795 semelhanças aos anteriores, com
763 *Candida* spp. para analisar se estas 796 sinergismo em todas as cepas testadas
764 podem potencializar a ação da droga. 797 como pode ser observado na Tabela 4.
765 Os valores variaram entre 1,38 e 925,56
766 µg/mL. A FFFLPG + FCZ expressou
767 um efeito sinérgico com uma redução

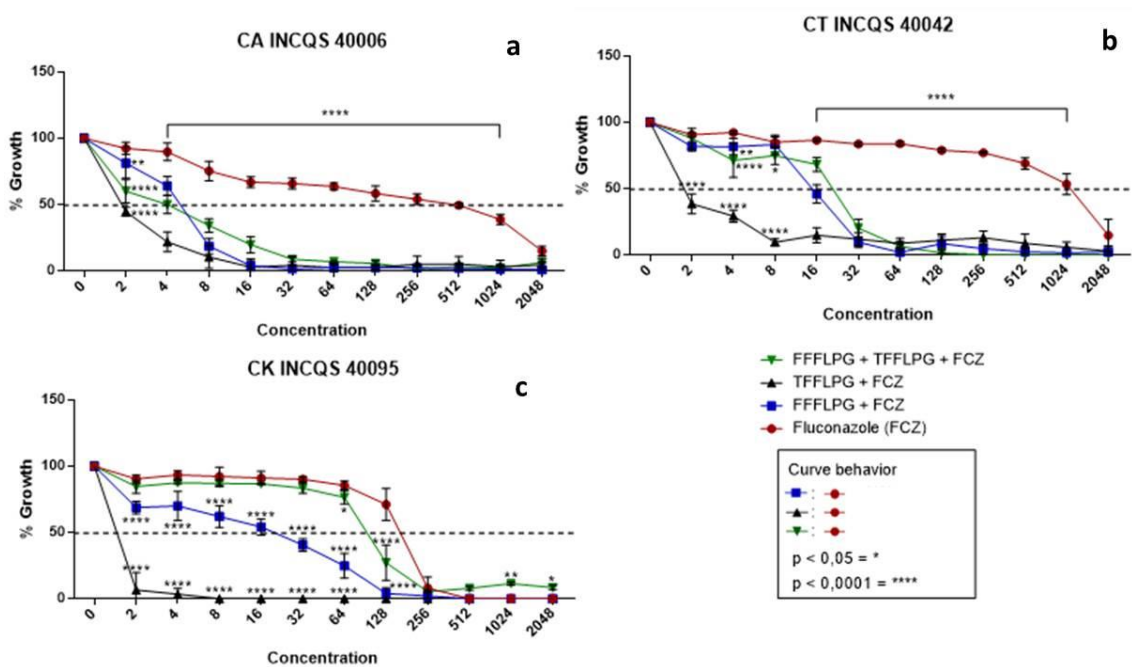
798

799 **Tabela 4:** IC₅₀ (µg/mL) das Frações Flavonoídica e Tânica de Folhas Frescas de
800 *Psidium guajava* em associação ao Fluconazol frente a linhagens de *Candida*.

Strains	FLUCONAZO L (FCZ)	FFFLPG + FCZ	TFFFLPG + FCZ	FFFLPG + TFFFLPG + FCZ
CA INCQS 40006	378,81	4,787	2,16	3,65
CT INCQS 40042	925,56	16,050	2,17	22,95
CK INCQS 40095	163,00	19,120	1,38	96,56

801 FCZ: Fluconazol, FFFLPG: Fração Flavonoídica de Folhas Frescas de *Psidium guajava*, TFFFLPG: Fração
802 Tânica de Folhas Frescas de *Psidium guajava*; CA: *Candida albicans*; CT: *Candida tropicalis*; CK:
803 *Candida krusei*; INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.
804

805 **Figura 5:** Efeito antifúngico das Frações Flavonoídica e Tânica de Folhas Frescas de *P.*
806 *guajava* isoladas e associadas com o antifúngico padrão.



807

808 FCZ: Fluconazol, FFFLPG: Fração Flavonoídica de Folhas Frescas de *Psidium guajava* L., TFFFLPG:
809 Fração Tânica de Folhas Frescas de *Psidium guajava*; CA: *Candida albicans*; CT: *Candida tropicalis*;
810 CK: *Candida krusei*; INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. $p < 0,05$; *($p < 0,1$)
811 quando comparado com o controle.
812

813 O fluconazol é um antifúngico 846 gálico, kaempferol e rutina, sendo o
814 de efeito fungistático, sendo 847 melhor efeito exercido pelo ácido
815 responsável pela instabilidade da 848 gálico.
816 membrana fúngica atuando na inibição 849
817 da enzima azol-desmetilase do 850
818 lanosterol 14 α , produto genético do 851
819 ERG11, uma enzima citocromo P450 852
820 essencial na via de síntese do ergosterol 853
821 (GROLL, LUCCA & WALSH, 1998). 854
822 Algumas tentativas de potencializar a 855
823 atividade desta droga através de 856
824 interações sinérgicas são ensaiadas com 857
825 outros fármacos comerciais frente a 858
826 isolados clínicos resistentes (SPITZER 859
827 et al., 2011). 860

828 Avaliando o efeito modificador 861
829 de extratos aquoso e hidroetanólico de 862
830 plantas do Gênero *Psidium*, dentre elas 863
831 *P. guajava*, em associação ao 864

832 Fluconazol, frente a *C. albicans* e *C.* 865
833 *tropicalis* Morais-Braga et al (2016) 866
834 onde obtiveram relações sinérgicas em 867
835 ambos extratos, corroborando com este 868
836 estudo. 869

837 Alguns compostos fenólicos 870
838 como ácido gálico, catequina, luteolina 871
839 e quercetina demonstraram potencial 872
840 antifúngico *in vitro* contra diferentes 873
841 espécies de *Candida*, entre elas *C.* 874
842 *albicans* e *C. tropicalis* (ALVES et al., 875
843 2014). Bisignano et al. (2000) refutou a 876
844 atividade antifúngica frente a *Candida* 877
845 *albicans* para os compostos ácido 878

849 Morais-Braga et al. (2015) em
850 seu estudo avaliou a ação de extratos
851 aquoso e hidroalcoólico de folhas de *P.*
852 *guajava* L. frente a cepas de *C. albicans*
853 e *C. tropicalis* ao realizar o teste
854 encontrou a IC₅₀ dos extratos que
855 variaram de 1803,02 a 5623,41 $\mu\text{g/mL}$,
856 sendo o valor encontrado superior aos
857 do presente estudo, porém vale ressaltar
858 que o presente trabalho utilizou
859 solventes extratores diferentes sendo
860 mais específicos e adequados à
861 prospecção de flavonoides e taninos
862 portanto os resultados provavelmente
863 seriam diferenciados também.

865 **3.4 Concentração Fungicida Mínima:** 866 **avaliação da associação das frações** 867 **individuais, associadas entre si e em** 868 **combinação com Fluconazol: Efeito** 869 **fungicida ou fungistático.**

871 Os valores variaram de 512 a \geq
872 4096 $\mu\text{g/mL}$, no primeiro momento
873 avaliamos as frações em sua atividade
874 intrínseca, onde apresentaram efeito
875 fungistático, pois reduziram a
876 população de leveduras no teste, os
877 valores das concentrações foi
878 semelhantes em todas as cepas testadas,

879 com exceção da associação das frações 904 x2) µg/mL (Figura 6), onde as duas
880 frente à cepa *C. krusei* apresentou 905 últimas mostraram que foram capazes
881 atividade fungicida na concentração 906 de alterar a transição fenotípica de *C.*
882 1024 µg/mL. 907 *albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis*

883 A associação das frações com o 908 reduzindo e chegando a inibir
884 Fluconazol, às concentrações que se 909 totalmente a manifestação das estruturas
885 destacaram foi frente à cepa CK 40095, 910 de filamentosas que atuam como
886 pois apresentaram efeito fungicida com 911 mecanismos de virulência fúngica.

887 valores de 512 µg/mL para as frações 912 O desempenho das frações no
888 isoladas associadas ao FCZ e 1024 913 dimorfismo, um fator virulência
889 µg/mL para as frações associadas entre 914 fúngico, é demonstrado na Fig. 7. A
890 si e com FCZ, sabendo que o FCZ é um 915 formação das hifas foi inibida
891 antifúngico fungistático quando 916 significativamente a partir da segunda
892 associados possivelmente ocorreu 917 concentração testada. Na menor
893 aumento da eficácia, promovendo uma 918 concentração a fração flavonoídica
894 atuação fungicida frente a esta cepa 919 mostrou efetividade na inibição da
895 resistente ao fármaco em questão. 920 virulência fúngicas frente a CT, nas

896 921 concentrações (2.048 e 4.096 µg / mL) o
897 **3.5 Atividade das frações na** 922 dimorfismo e propagação de hifas para
898 **morfologia fúngica: controle de** 923 CA e CT foi marcadamente inibido
899 **virulência** 924 (Fig. 7).

900

901 No teste micromorfológico
902 foram utilizadas três concentrações 512
903 (CSA/4), 2.048 (CSA) e 4.096 (CSA

925

926

927

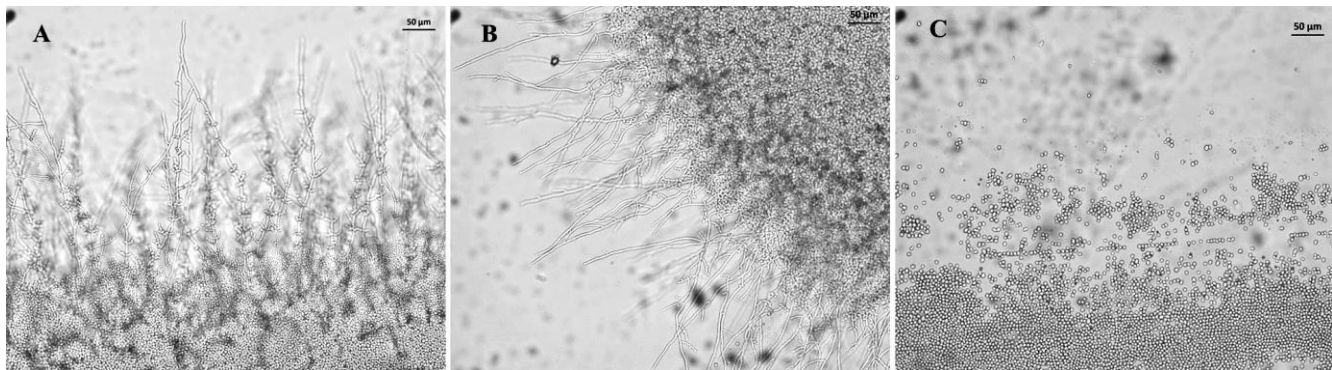
928

929

930

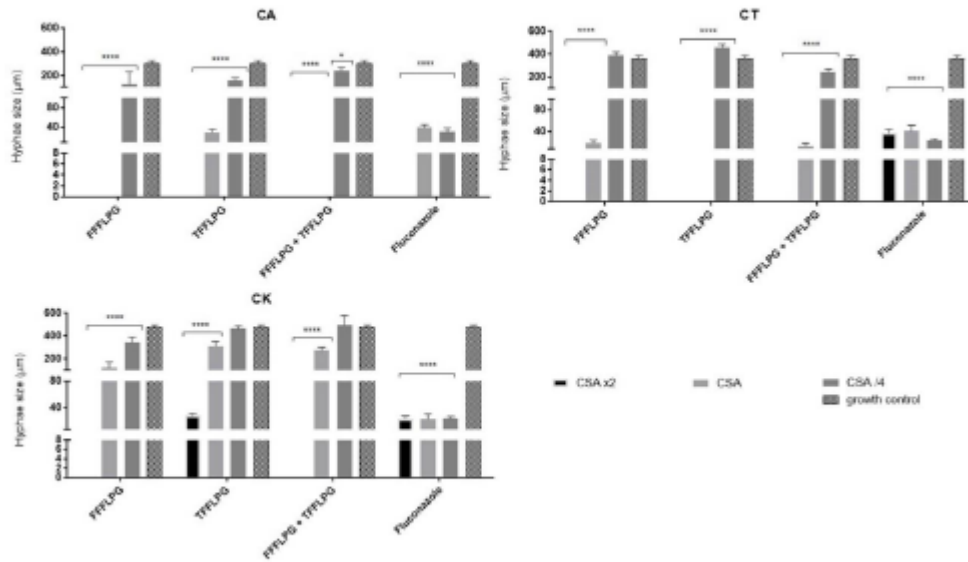
931

932 **Figura 6:** Demonstração da progressiva redução hifal. **A.** Controle de crescimento
933 positivo, **B.** Início de regressão a partir de 512 µg/mL e **C.** Inibição total de dimorfismo.



934
935

Figure 7: Measurement of the hyphae extension under the action of the fractions: Flavonoid and Tannic of fresh Leaves of *P. guajava* against *C. albicans*, *C. tropicalis* and *C. krusei*.



Subtitle: CSA: Superior Concentration Analyzed, CSAx2 (4,096 µg/mL), CSA (2,048 µg/mL) and CSA/4 (512 µg/mL). FFFLPG: Flavonoid Fraction of Fresh Leaves of *Psidium guajava*, TFFLPG: Tannic Fraction Fresh Leaves of *Psidium guajava*; CA: *Candida albicans*; CT: *Candida tropicalis*; CK: *Candida krusei*;

937 A fração flavonoídica na 970 dimorfismo de *C. albicans* e *C.*
938 concentração de 2,048 µg/ mL e 4,096 971 *tropicalis* diminuindo a formação de
939 µg/ mL inibiu de maneira 972 hifas em concentrações crescentes
940 estatisticamente relevante, em todas as 973 foram aumentadas, efeito semelhante ao
941 cepas, o desenvolvimento de filamentos. 974 nosso estudo.

942 A fração tânica apresentou melhor 975
943 potencial contra CA e CT na 976
944 concentração CSAx2. A associação de 977
945 frações mostrou-se eficiente na redução 978
946 de hifas, apesar de seu efeito ter sido 979
947 destacado com Fração Flavonoídica 980
948 isolada. As frações mostraram ser mais 981
949 eficazes do que o antifúngico referência, 982
950 especialmente a Fração Flavonoídica. 983

951 Um dos mecanismos mais 984
952 importantes de virulência de *Candida* é 985
953 o dimorfismo celular, este estado 986
954 dimórfico pode ser definido como a 987
955 habilidade de alterar a morfologia das 988
956 células, reversivelmente, variando entre 989
957 a forma de levedura e hifas. Isso se dá 990
958 pela ejeção de uma estrutura 991
959 filamentosa, tornando-se de dispersivo 992
960 para invasivo, respectivamente, 993
961 caracterizando um processo comumente 994
962 presenciado em candidemia sistêmica 995
963 (Lu et al., 2014). 996

964 Alterações na morfologia 997
965 fúngica, a partir de atividade de extratos 998
966 de *P. guajava* foi relatada por Morais- 999
967 Braga et al. (2015) em concentrações de 1000
968 4,096, 8,192 e 16,384 µg/mL mostrou 1001
969 que foram capazes de alterar o 1002

4. CONCLUSÃO

977 As frações flavonoídica e tânica
978 das folhas frescas de *P. guajava* tiveram
979 nesse estudo seu potencial revelado a
980 partir dos experimentos feitos, as
981 frações apresentaram em sua
982 composição compostos fenólicos de
983 efeito antifúngico já evidenciado que
984 podem ter contribuído para o efeito
985 sinérgico dos testes. Sendo verdadeiros
986 agentes antifúngicos ativos, inibiram as
987 colônias de *Candida* spp. em uso
988 isolados, porém obteve melhor
989 atividade em junção com o fármaco,
990 pois potencializaram a ação do
991 antifúngico sistêmico de referência
992 (Fluconazol), reduzindo sua
993 concentração e aumentando a sua
994 efetividade, regrediu e afetou um
995 importante fator de virulência fúngica
996 que é a transição morfológica a partir da
997 emissão de hifas. A fração tânica
998 mostrou-se em evidência com os
999 melhores resultados dos testes, com um
desempenho mais significativo no teste
em associação ao antifúngico de
referência. Esses resultados mostram

- 1003 que estas frações possuem constituintes 1044
1004 ativos antifúngicos, no entanto são 1045
1005 necessários estudos mais aprofundados 1046
1006 no intuito de comprovar a efetividade e 1047
1007 a segurança, de fato esses resultados faz 1048
1008 desse produto natural um forte 1049
1009 candidato a uma nova droga ou 1050
1010 coadjuvante ao tratamento das 1051
1011 patologias fúngicas. 1052
1012 Estudos adicionais usando 1053
1013 modelos animais são necessários para 1054
1014 verificar a eficácia *in vivo* das mesmas. 1055
1015 1056
1016 **4. REFERÊNCIAS** 1057
1017 1058
1018 Alves C.T, Ferreira I.C, Barros L., Silva 1059
1019 S., Azeredo J., Henriques M., 2014, 1060
1020 Antifungal activity of phenolic 1061
1021 compounds identified in flowers from 1062
1022 North Eastern Portugal against *Candida* 1063
1023 species. *Future microbiol.*; 9 (2): 139- 1064
1024 146. 1065
1025 1066
1026 Barbosa, W.L.R. 2004. Manual para 1067
1027 análise fitoquímica e cromatografia de 1068
1028 extratos vegetais, Bélem-PA: Revista 1069
1029 Científica da UFPA, vol.4. 1070
1030 1071
1031 Bisignano G., et al., 2000, 1072
1032 Antimicrobial activity of *Mitracarpus* 1073
1033 *scaber* extract and isolated constituents. 1074
1034 *Let Appl Microbiol.*; 30 (2): 105-108. 1075
1035 1076
1036 Borba, A.M., Macedo, M., 2006, 1077
1037 Plantas medicinais usadas para a saúde 1078
1038 bucal pela comunidade do bairro Santa 1079
1039 Cruz, Chapada dos Guimarães, MT, 1080
1040 Brasil. *Acta bot. bras.* 20, 771-782. 1081
1041 1082
1041 Calderone R.A, Fonzi W.A. 2001, 1083
1042 Virulence factors of *Candida albicans*. 1084
1043 *Trends Microbiol.*;9:327—35. 1085
1086
1087
1088 Calixto Júnior, J. T. et al. 2015, 1089
1089 Phytochemical analysis and modulation
of antibiotic activity by *Luehea*
paniculata Mart. & Zucc. (Malvaceae)
in multiresistant clinical isolates of
Candida spp. *BioMed Research*
International, v. 2015.
Camacho- Hernández, I. L. et al. 2004,
Antifungal activity of fruit pulp extract
from *Psidium sartorianum*. *Fitoterapia*,
v. 75, p. 401–404.,
Cao, H., Zhang, A., Zhang, F.M., Wang,
Q. Q., Zhang, H., Song, Y. H., Zhoub, Y.
Sun, H., Yan, G. L., Han, Y. and Wang,
X., 2014, Ultra-performance liquid
chromatography tandem mass
spectrometry combined with automated
MetaboLynx analysis approach to
screen the bioactive components and
their metabolites in Wen-Xin-Formula ,
Biomed. Chromatogr, 28: 1774–1781.
Chang, C. H. et al. 2013, Unique
bioactive polyphenolic profile of guava
(*Psidium guajava*) budding leaf tea is
related to plant biochemistry of budding
leaves in early dawn. *Journal of the*
Science of Food and Agriculture, v. 93,
n. 4, p. 944-954.
Chen K.J, Chen T.L, Lai C.C, Sun M.H.
2008, Endophthalmitis: antibacterial
activity of precipitates of vancomycin
and ceftazidime. *Journal of clinical*
microbiology.; 46:2149.
Coutinho H.D.M, Costa J.G.M, Lima
E.O, Falcão-Silva V.S, Siqueira-Júnior
J.P. 2008, Enhancement of the antibiotic
activity against a multiresistant
Escherichia coli by *Mentha arvensis* L.
and Chlorpromazine. *Chemotherapy*,
54 (4):328–330.
Díaz-de-Cerio, E., Gómez-Caravaca, A.
M., Verardo, V., Fernández-Gutiérrez,

- 1090 A., & Segura-Carretero, A., 2016, 1136 perspectives in medicine, v. 5, n. 1, p.
1091 Determination of guava (*Psidium* 1137 a019273.
1092 *guajava* L.) leaf phenolic compounds 1138
1093 using HPLC-DAD-QTOF-MS, Journal 1139
1094 of Functional Foods, 22 ,376–388. 1140
1141
1095 Ernst, E.J.; Klepser, M.E.; Ernst, M.E.; 1142
1096 Messer, S.A.; Pfaller, M.A., 1999, *In* 1143
1097 *vitro* pharmacodynamic properties of 1144
1098 MK-0991 determined by time-kill 1145
1099 methods. Diagnostic microbiology and 1146
1100 infectious disease, 33, 75-80. 1147
- 1101 Fenner, R., Betti, A.H., Mentz, L.A., 1148
1102 Rates, S.M.K., 2006, Plantas utilizadas 1149
1103 na medicina popular brasileira com 1150
1104 potencial atividade antifúngica. Braz J 1151
1105 Pharm Sci, 42, 369-394. 1152
- 1106 Flores, G., Dastmalchi, K., Wu, S.B., 1153
1107 Whalen, K., Dabo, A.J., Reynertson, K. 1154
1108 A., Foronjy, R. F., D’Armiento, J. M., 1155
1109 Kennelly, E. J., 2015, Phenolic-rich 1156
1110 extract from the Costa Rican guava 1157
1111 (*Psidium friedrichsthalianum*) pulp with 1158
1112 antioxidant and anti-inflammatory 1159
1113 activity. Potential for COPD therapy, 1160
1114 Food Chem, 141(2): 889–895. 2013, 1161
1115 doi:10.1016/j.foodchem.2013.03.025. 1162
- 1116 Groll A.H, Lucca A.J, Walsh T.J., 1998, 1163
1117 Emerging targets for the development 1164
1118 of novel antifungal therapeutics. Trends 1165
1119 Microbiol.; 6 (3):117–124. 1166
- 1120 Gutiérrez, R. M. P., Mitchell, S. & 1167
1121 Solis, R. V., 2008, *Psidium guajava*: A 1168
1122 review of its traditional uses, 1169
1123 phytochemistry and pharmacology. 1170
1124 Journal of Ethnopharmacology, 117 (1); 1171
1125
- 1126 Javadpour, M.M.; Juban, M.M.; Lo, 1172
1127 W.C.; Bishop, S.M.; Alberty, J.B.; 1173
1128 Cowell, S.M.; Becker, C.L.; 1174
1129 McLaughlin, M.L. 1996, Against 1175
1130 antimicrobial peptides with low 1176
1131 mammalian cell toxicity. Journal of 1177
1132 Medicinal Chemistry, 39, 107–3113. 1178
1179
- 1133 Köhler, J. R.; Casadevall, A.; Perfect, J. 1180
1134 2015, The spectrum of fungi that infects 1181
1135 humans. Cold Spring Harbor 1182
- Ksouri S, Djebir S, Bentorki AA, Gouri 1183
A, Hadeif Y, Benakhla A. 2017, 1184
Antifungal activity of essential oils 1185
extract from *Origanum floribundum* 1186
Munby, *Rosmarinus officinalis* L. and 1187
Thymus ciliatus Desf. against *Candida* 1188
albicans isolated from bovine clinical 1189
mastitis. J Mycol Med; 27:245–9. 1190
- Kuan-Chou Chen, Chao-Ming Chuang, 1191
Li-Yun Lin, Wen-Ta Chiu, Hui-Er 1192
Wang, Chiu-Lan Hsieh, Tsuimin Tsai & 1193
Robert Y. Peng, 2010, The 1194
polyphenolics in the aqueous extract of 1195
Psidium guajava kinetically reveal an 1196
inhibition model on LDL glycation, 1197
Pharmaceutical Biology, 48:1, 23-31, 1198
DOI: 10.3109/13880200903029365. 1199
- Lapenna, E. A. M. et al. 2003, 1200
Actividad bactericida y fungicida de 1201
algunas plantas utilizadas en la 1202
medicina tradicional venezolana. 1203
Revista del Instituto Nacional de 1204
Higiene Rafael Rangel, v. 34, p. 6-92. 1205
- Lopez-Martinez R., 2010, Candidosis, a 1206
new challenge. Clin Dermatol;28:178— 1207
84. 1208
- Lu, Y., Su, C., Liu, H. 2014. *Candida* 1209
albicans hyphal initiation and 1210
elongation. Trends microbiol, 22, 707- 1211
714. 1212
- Mendes. J.M., 2011, Investigação da 1213
atividade antifúngica do óleo essencial 1214
de *Eugenia caryophyllata* Thunb. sobre 1215
cepas de *Candida tropicalis*. 1216
Dissertação de Mestrado em Produtos 1217
Naturais e Sint ticos Bioativos. 1218
Universidade Federal da Paraíba – 1219
UFPB, João Pessoa – PB. 1220

1180 Miceli MH, Diaz JA, Lee SA. 2011, Available at
1181 Emerging opportunistic yeast infections. 1228 <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/07/renisus.pdf>
1182 Lancet Infect Dis; 11:142—51. 1229
1183 1230
1184 Morais-Braga, M. F. B., et al. 2016, 1231 Scherer, R.; Godoy, HT., 2014, Effects
1185 *Psidium guajava* L. and *Psidium* 1232 of extraction methods of phenolic
1186 *brownianum* Mart ex DC.: Chemical 1233 compounds from *Xanthium strumarium*
1187 composition and anti-*Candida* effect in 1234 L. and their antioxidant activity. Rev.
1188 association with fluconazole. Microbial 1235 bras. plantas med., Botucatu , v. 16, n.
1189 pathogenesis, , 95: 200-207. 1236 1, p. 41-46,
1190 1237 <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722014000100006>
1191 Morais-Braga, M.F.B., 2017, *Psidium* 1238
1192 *guajava* L., from ethnobiology to 1239
1193 scientific evaluation: Elucidating 1240 Sidrin, J.J.C., Rocha, M.F.G., 2010,
1194 bioactivity against pathogenic 1241 Micologia médica à luz de autores
1195 microorganisms, Journal of 1242 contemporâneos. Rio de Janeiro:
1196 Ethnopharmacology, 1243 Guanabara Koogan, p. 388.
1197 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.11.017> 1244
1198 1245 Soto-Vaca, A.; Gutierrez, A.; Losso,
1199 Oliveira, D. A., Sobral, M. E. G Duarte, 1246 J.N.; Xu, Z.; Finley, J.W., 2012,
1200 M. G. R., Fonseca, J. F., França- 1247 Evolution of phenolic compounds from
1201 Botelho, A. C. 2010, Atividade 1248 colour and flavor problems to health
1202 antifúngica do extrato de folhas de 1249 benefits. J. Agric. Food Chem. , 60,
1203 *Psidium guajava* sobre leveduras do 1250 6658–6677.
1204 gênero *Candida*. Rev. Fac. Odontol. P. 1251 Spitzer M, et al. 2011, Cross-species
1205 Alegre. 51, 24-26. 1252 discovery of syncretic drug
1253 combinations that potentiate the
1206 Paul S, Moye-Rowley WS. 2014, 1254 antifungal fluconazole. Mol Syst Biol. 7
1207 Multidrug resistance in fungi: regulation 1255 (1): 499.
1208 of transporter-encoding gene 1256
1209 expression. Front Physiol; 5:143. 1257
1210 1258 Stoppa, M.A.; Casemiro, L.A.;
1211 Pfaller MA, Diekema DJ. 2007, 1259 Vinholis, A.H.C.; Cunha, W.R.; Silva,
1212 Epidemiology of invasive candidiasis: a 1260 M.L.A.; Martins, C.H.G.; Furtado,
1213 persistent public health problem. Clin 1261 N.A.J.C., 2009, Estudo comparativo
1214 Microbiol Rev; 20:133—63. 1262 entre as metodologias preconizadas pelo
1263 CLSI e pelo EUCAST para avaliação da
1215 1264 atividade antifúngica. Química Nova
1216 Rauha, J. P., Remes, S., Heinonen, M., 1265 [online], 32, 498-502.
1217 Hopia, A., Kahkonen, M., Kujala, T., 1266
1218 Pihlaja, K., Vuorela, H., and Vuorela, 1267 Suwanmanee, S.; Kitisin, T.;
1219 P., 2000, Antimicrobial effects of 1268 Luplertlop, N. 2014, *In vitro* screening
1220 Finnish plant extracts containing 1269 of 10 edible thai plants for potential
1221 flavonoids and other phenolic 1270 antifungal properties. Evidence-Based
1222 compounds. Int. J. Food Microbiol., 56, 1268 Complementary and Alternative
1223 3–12. 1269 Medicine, v. 2014.
1224 1270
1225 RENISUS. 2009, Relação Nacional de 1271
1226 Plantas Medicinais de Interesse ao SUS.

1272 Terrill, T.H., Rowan, A.M., Douglas, 1288 la medicina tradicional peruana.
 1273 G.B., Barry, T.N. 1992, Determination 1289 Aislamiento de 3'-Formil - 2',4',6' -
 1274 of extractable and bound condensed 1290 trihidroxidihidrochalcona, principio
 1275 tannin concentration in forage plants, 1291 activo de *Psidium acutangulum*. Revista
 1276 protein concentrate meals and cereal 1292 da Sociedade Química del Perú, v. 77,
 1277 grains. Journal of the Science of Food 1293 p. 199-204.
 1278 and Agriculture, London, v.58, n.3, 1294
 1279 p.321-329. 1295 Zida A, Bamba S, Yacouba A,
 1280 1296 Ouedraogo-Traore R, Guiguemde RT.
 1297 2017, Anti-*Candida albicans* natural
 1281 Van Vuuren, S.F., Naidoo, D., 2010, An 1298 products, sources of new antifungal
 1282 antimicrobial investigation of plants 1299 drugs: a review. J Mycol Med;27:1—
 1283 used traditionally in southern Africa to 1300 19.
 1284 treat sexually transmitted infections. J 1301
 1285 ethnopharmacol. 130, 552-558. 1302
 1286 Wen, L., et al. 2011, Actividad 1303
 1287 antifúngica de cuatro plantas usadas em



Contents lists available at ScienceDirect

Food and Chemical Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchemtox

Analysis by UPLC-MS-QTOF and antifungal activity of guava (*Psidium guajava* L.)

Camila Fonseca Bezerra^{a,*}, Janaína Esmeraldo Rocha^a, Maria Karollyna do Nascimento Silva^a, Thiago Sampaio de Freitas^a, Amanda Karine de Sousa^a, Antônia Thassya Lucas dos Santos^a, Rafael Pereira da Cruz^a, Maciel Horácio Ferreira^a, Josefa Carolaine Pereira da Silva^a, Antonio Judson Targino Machado^a, Joara Nályda Pereira Carneiro^a, Débora Lima Sales^a, Henrique Douglas Melo Coutinho^a, Paulo Riceli Vasconcelos Ribeiro^b, Edy Sousa de Brito^b, Maria Flaviana Bezerra Morais-Braga^a

^a Laboratory of Microbiology and Molecular Biology, Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri - URCA, Crato, CE, Brazil

^b Multiuser Laboratory of Natural Products Chemistry LMQPN, Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Candida spp.
Phenolic compounds
Fungistatic
Synergism
Antiplemorphism
Fluconazole

ABSTRACT

Psidium guajava L. is a plant widely used for food and in folk medicine all over the world. Studies have shown that guava leaves have antifungal properties. In this study, Flavonoid and Tannic fractions were tested to investigate their chemical composition and antifungal potential *in vitro*. 21 compounds in the two fractions, presenting a higher content of phenolic compounds. The antifungal assays were performed against *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida krusei* by microdilution to determine the IC₅₀ and the cell viability curve. Minimal Fungicidal Concentration (MFC) and the inhibitory effects of the association of the fractions with Fluconazole, as well as the assays used to verify any morphological changes were performed in microculture chambers based on the concentrations from the microdilution. The IC₅₀ of the isolated fractions and the fractions associated with each other were calculated, varying from 69.29 to 3444.62 µg/mL and the fractions associated with fluconazole varied from 925.56 to 1.57 µg/mL, it was clear that the association of the natural product with the antifungal presented a synergism. The fractions affected pleomorphism capacity and have a potential antifungal activity as they caused fungal inhibition in isolated use, potentiated the action of Fluconazole, reducing its concentration and impeding morphological transition, one of the virulence factors of the genus.

1. Introduction

Candida spp. are normal commensal microorganisms of the human biota (Soll, 2002) that in certain circumstances act as opportunistic pathogens and can lead to superficial and serious systemic infections. In fact, this genus is the most frequently identified in hospital fungal infections termed candidiasis (Calderone, 2002). They are yeast-like microorganism whose best known species, which is usually associated with disease states, is *Candida albicans*, however other species such as *C. tropicalis*, *C. glabrata* and *C. krusei* are frequently identified. (Zida et al., 2017).

The *Candida* spp. incidence has been increasing in recent years, this being due to the greater vulnerability of the population when performing procedures such as organ transplants, in oncological patients

and those who use immunosuppressive drugs (Arendrup, 2010).

Therefore, candidiasis becomes the most prevalent fungal pathology affecting humans where the main obstacle is that it is associated with a morbidity and mortality rate of 10–49% in immunocompromised patients (Pfaller and Diekema, 2007). Extensive use of antibacterials reduce the competitiveness in the human biota and favors the growth of *Candida* spp. which opportunely transition from commensals to pathogens (Shankar et al., 2015).

Virulence factors allow adaptation to new circumstances since they allow the fulfillment of important criteria necessary for the survival of the species, among them are invasive potential and tolerance to high temperatures, lysis promotion and absorption of human tissues, as well as immunological defense resistance (Köhler et al., 2015). Virulence factors may range from the formation of enzymes such as secreted

* Corresponding author. Laboratory of Microbiology and Molecular Biology, Department of Biological Chemistry, Regional University of Cariri - URCA, Rua Cel. Antônio Luís 1161, Pimenta, Crato, CE 63105-000, Brazil.

E-mail address: camilawasidi@gmail.com (C.F. Bezerra).

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.05.021>

Received 16 March 2018; Received in revised form 2 May 2018; Accepted 7 May 2018
0278-6915/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Please cite this article as: Bezerra, C.F., Food and Chemical Toxicology (2018), <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.05.021>

aspartyl proteinases (SAPs), phospholipases, production of surface adhesins and dimorphism capacity with hyphal production (Gow et al., 2011). Hyphal development protects *C. albicans* from elimination by the immune system and promotes invasion of host epithelial surfaces (Williams and Lewis, 2011).

In fact, fungal infections continue to be a barrier for treatments in use even with existing antifungal drugs (Paramythiotou et al., 2014). Resistance to existing antifungal drugs has become a conflict and the clinical efficacy of these drugs is at risk from the advent of multi-drug resistant species (Paul and Moye-Rowley, 2014).

The *Psidium* genus has a number of biological activities proven through *in vitro* and *in vivo* assays, among which, is an antifungal effect (Camacho-Hernández et al., 2004; Lapenna et al., 2003; Suwanmanee et al., 2014; Wen et al., 2011). Among the genus' species, *Psidium guajava* L. has ethnomedicinal value, where it is known for its therapeutic versatility, being used, among other things, for the treatment of symptoms associated with infections caused by *Candida* spp. (Morais-Braga et al., 2016).

Natural plant products are reported to be rich sources of various compounds that may serve as the basis for the rational drug model (Ksouri et al., 2017; Zida et al., 2017). Research has been carried out to promote the combination of commercial drugs, for which the resistance phenomenon has already been verified, with natural products in the form of extracts, fractions, essential oils or isolated constituents in an attempt to circumvent *Candida* spp. resistance (Calixto Júnior et al., 2015; Rekha and Vidyasagar, 2014; Singh et al., 2013).

Faced with these facts, research that seeks therapeutic alternatives for the cure and prevention of systemic infections has been gaining strength every day, in an attempt to find safer medications, consequently with fewer adverse effects, capable of overcoming the barrier that is fungal resistance to available drugs. The objective of this research was to investigate the chemical composition, the *in vitro* effects on growth inhibition, and the possible morphological alterations in yeast from the fractions obtained from dried *P. guajava* L. leaves in isolation, in association with each other and in conjunction with the antifungal fluconazole.

2. Methodology

2.1. Collection area and plant material

The plant material was collected in a rural area in the Crato municipality, south of Ceará, Brazil (425 m, 07°14'18" south latitude and 39°23'37" west longitude of Greenwich). The collection period was between 8:30 a.m. and 10:30 a.m. in the month of March/2017. From the material collected, an exsiccate was produced and subsequently deposited in the Cariense Dárdano de Andrade-Lima Herbarium (HCDAL) of the Regional University of Cariri - URCA, identified and registered under number 13.222. The study was carried out using young and healthy *Psidium guajava* L. leaves, locally known as guava, without any indication of contamination by parasites. Fresh leaves, which were later crushed into small pieces, were used to obtain the fractions.

2.2. Tannic fraction extraction

For the preparation of the Tannic fraction, 20 g of the crushed dried leaves were mixed with 50 ml of an acetone/water solution (7:3), then placed for 30 min in an ultrasonic bath at 5 °C. The residue was filtered and the procedure was repeated two more times. The liquid phases were combined and taken to the rotary evaporator to remove the acetone. The aqueous phase was partitioned with 50 mL of petroleum ether three times, after which the sample was frozen and then lyophilized (Terrill et al., 1992).

2.3. Extraction of the flavonoid fraction

In order to extract the flavonoid fraction, we used 10 g of the plant material and added 100 mL of hexane (P.A), using the ultrasonic bath, heating the solution at 5 °C for 10 min and followed by centrifuging at 3000 rpm for 10 min. The material was filtered and the procedures were repeated two more times. After the residue above was obtained, 100 mL of chloroform was added, taken to the ultrasonic bath for 10 min, and the same steps as above were followed. In the last phase 50 mL of ethyl acetate were added, this was later taken to the rotary evaporator (Barbosa et al., 2004).

2.4. Identification of compounds by ultrafine liquid chromatography coupled to quadruple time-of-flight (UPLC-QTOF) system

The identification of the compounds present in the fractions was performed in an Acquity[®] UPLC system coupled to a Quadruple Time-of-Flight (QTOF) system (Waters Corporation, Milford, USA), at the Chemistry and Natural Products Laboratory, Embrapa Tropical Agroindustry (Fortaleza, Ceará). The chromatographic assays were performed on Waters Acquity[®] UPLC BEH column (150 × 2.1 mm, 1.7 μm), with a fixed temperature at 40 °C, mobile water phases with 0.1% formic acid (A) and acetonitrile with 1% formic acid (B), gradient ranging from 2% to 95% B (15 min), flow rate of 0.4 ml/min and injection volume of 5 μl. The ESI mode was obtained in the range of 110–1180 Da, fixed source temperature at 120 °C, desolvation temperature of 350 °C, desolvation gas flow of 500 L/h, extraction cone of 0.5 V, 2.6 kV capillary voltage. The ESI + mode was acquired in the range of 110–1180 Da, fixed source temperature of 120 °C, desolvation temperature of 350 °C, desolvation gas flow of 500 L/h and 3.2 kV capillary voltage. Leucine enkephalin was used as a lock mass. The mode of acquisition was MSE (high energy mass spectrometry). The instrument was controlled by the Masslynx[®] 4.1 software (Waters Corporation, Milford, USA).

2.5. Antifungal assays

2.5.1. Strains and culture media

The utilised standard strains were obtained from the Oswaldo Cruz Culture Collection (FIOCRUZ) of the Brazilian Institute of Health Quality Control (INCQS), these being *Candida albicans* 40006, *Candida tropicalis* 40042 and *Candida krusei* 40095. The strains were inoculated in Sabouraud Dextrose Agar (SDA, KASVI) and incubated for 24 h at 37 °C. Thereafter, yeast aliquots were transferred to test tubes each containing 3 mL sterile (0.9%) sodium chloride solution. The inoculum concentration was standardized by comparing to the McFarland scale 0.5. The double concentrate Sabouraud Dextrose broth (SDB, HIMEDIA), was used in microdilution assays. In the micro-morphological analysis depleted Potato Dextrose Agar (PDA) with bacteriological agar was used.

2.5.2. Drugs, reagents and solution preparation

Dimethyl sulfoxide (DMSO, Merck, Darmstadt, Germany) was used for the dilution of the fractions, and the antifungal fluconazole (Capsule - Prati donaduzzi), diluted in water, was used as a reference medicine. The product solution was prepared by weighing 0.05 g of the fractions and then diluting this into 1 mL of DMSO. To obtain the desired concentrations for the assays, the fractions were further diluted in sterile distilled water (4096 μg/mL) so that the DMSO (0.5%) concentration would not exert any activity on the tested cells (Stoppa et al., 2009).

2.5.3. IC₅₀ determination and obtaining the cellular viability curve

In this test we used the fractions in isolation and combined with each other through the 96-well plate broth microdilution method. Each well was filled with 100 μL of CSD containing 10% fungal inoculum and then 100 μL of the natural product (4096 μg/mL), or fluconazole

(antifungal reference) in the same concentration, was added to the first well followed by serial dilution. The concentrations in the wells ranged from 2 to 2048 $\mu\text{g/mL}$. The last well was used as a growth control (Javadpour et al., 1996). Controls were also prepared for the product diluents (with 0.9% sodium chloride solution in place of the inoculum) and sterility control of the medium. All tests were performed in quadruples. The plates were incubated at 37 °C for 24 h and subsequently read on an ELISA spectrophotometer (Thermoplate[®]) at a wavelength of 630 nm. The results obtained in the ELISA assays were used to construct the cell viability curve and the IC_{50} of the fractions (Morais-Braga et al., 2016).

2.5.4. Determination of the minimum fungicidal concentration (MFC)

For this test, the tip of a sterile rod was inserted into each well of the microdilution test plate after the 24 h incubation (except for the sterility control). After mixing the medium in each well, the stem was taken to a Petri dish containing SDA, with the aid of a guide bracket attached to the bottom of the plate for yeast subculture. After 24 h of incubation, the plates were inspected for the formation of any *Candida* colonies (Ernst et al., 1999), with modifications. The concentration in which there was no fungal colony growth was considered the MFC of the natural product.

2.5.5. Evaluation of the modifying effect on fluconazole action

Initially, the action of the fractions and fluconazole were verified against the growth of yeasts individually, where in this test the effect of the isolated fractions and their combination with the reference drug was evaluated, in order to verify whether or not there was potentiation of the antifungal action by the fractions. For this, the natural product was used at a sub-inhibitory concentration (MFC/16), according to the methodology used by Coutinho et al. (2008) Modified. If the fraction potentiates the action of the antifungal, the verified effect is considered of the synergic type, if it interfered the action of this antifungal, an antagonistic effect would be verified. The plates were filled with 100 μL of medium + inoculum + fraction and then microdiluted with 100 μL of the 4096 $\mu\text{g/mL}$ fluconazole concentration added to the first well of each of the columns to undergo serial dilution at concentrations ranging from 2 to 2048 $\mu\text{g/mL}$. The plates were incubated at 37 °C for 24 h. The reading was performed on an ELISA spectrophotometric apparatus (Thermoplate[®]).

2.5.6. Effect of the fractions and fluconazole on fungal morphology

To determine if the individual and combined fractions caused changes in fungal morphology, by inhibiting morphological transition expression, considered an important fungal virulence factor, humid sterile micro-culture chambers were prepared for yeast observation. Three milliliters of depleted PDA medium by dilution were poured in the lamina containing the Superior Concentration Assayed - SCA x2 (4096 $\mu\text{g/mL}$), SCA (2048 $\mu\text{g/mL}$) and SCA/4 (512 $\mu\text{g/mL}$). Subculture aliquots were withdrawn from the Petri dishes to make two parallel streaks on the solid medium (PDA), which were then covered with a sterile coverslip. The chambers were placed in the incubator for 24 h (37 °C) and were inspected and recorded by an optical light microscope (AXIO IMAGER M2-3525001980-ZEISS- Germany) using a 20X objective. A control was performed for yeast growth (hyphae stimulated in nutrient-lacking medium) as well as a control with the conventional antifungal fluconazole for comparative purposes. The assays were performed according to Sidrin and Rocha (2010) and Mendes (2011), with modifications with respect to concentrations and media used.

2.5.7. Measurement of the extension of filamentous structures

It was possible to measure hyphae and pseudohyphae extensions, as well as the reduction in values after the action of the fractions, through the software Zen acting in conjunction with an optical microscope (AXIO IMAGER M2-3525001980- ZEISS- Germany). Five photos from each slide were taken, according to the concentrations, and from each photo

ten hyphae/pseudohyphae were randomly chosen to be measured, after which the arithmetic mean of the length of each slide was calculated where in the end the means were combined.

2.6. Statistical analysis

For the statistical analysis, the software Graphpad Prism, v. 5.0 was used.

The data obtained were checked for their normal distribution and then analyzed by a two-way ANOVA ($P < 0.05$; $*P < 0.1$; $****P < 0.0001$), comparing the values for each concentration of the extract, point by point, with Bonferroni's post hoc test. The IC_{50} values were obtained by non-linear regression with interpolation of standard curve unknowns obtained from fungal growth as a function of extract concentration and expressed in $\mu\text{g/mL}$. To analyze their values, multiple t-tests were used, one per line, whose statistical significance was determined by the Holm-Sidak method, with $\alpha \leq 0.05$.

3. Results

3.1. Chemical constituent identification - UPLC-ESI-QTOF-MS

The chromatograms of the FFDLPG and TFDLPG fractions are shown in Fig. 1 (A) and (B), respectively. The characterized compounds are summarized in Table 1 with the relevant data, including retention time, experimental mass and calculated m/z , molecular formula, error values provided by the software and the QTOF- MS/MS fragments. All compounds were characterized by the interpretation of their mass spectra determined by QTOF/MS and data analysis provided in the literature.

From the chemical analyzes chromatograms of the fractions it is possible to notice in Table 1 the presence of 11 compounds, of which seven were identified in the literature and classified chemically, these being three flavonoids (Reynoutrina (quercetin-3-O- β -D-xylopyranoside), Guajaverina (quercetin-3-O- α -L-arabinopyranoside) and Morin), a condensed tannin (Catechin), two hydrolysable tannins (Ellagic acid and Guavinósido B), an acetophenone (Myricaphenone B), whereas the other compounds could not be identified in the literature.

In Table 2 we have the chemical composition of the FTFSPG where ten compounds were found, six of which were identified, among them two flavonoids (Quercetin and 2,6-dihydroxy-3-methyl-4-O-(6"-O-galloyl- β -D-glucopyranosyl)-benzophenone), a condensed tannin (Catechin), a hydrolyzable tannin (Guavinósido C), an elagotonine (Vescalagin/Castalagin Isomer, (1S*,5S*)-2,2-Bis(biphenyl-4-yl)-5-indian-1-yltetrahydrofuran(IV-81)), with the predominance of phenolic compounds in both fractions being perceived. According to the phytochemical analyzes, when the components between the tables are compared, the presence of Catechin is notorious in both fractions.

3.2. Growth inhibition-cellular viability curve and IC_{50}

Table 3 shows the IC_{50} from the Flavonoid and Tannic *P. guajava* L. dry leaves Fractions tested in isolation and in combination with each other against different *Candida* species. Values ranged from 69.29 to 3444.62 $\mu\text{g/mL}$. The flavonoid fraction alone did not show significant inhibition potential. The isolated tannic fraction presented significant values in relation to the antifungal, since the concentrations for CA 40006 and CT 40042 were reduced with the lowest value of 69.29 $\mu\text{g/mL}$ being for CA 40006 (see Fig. 2).

The association of the fractions was more effective than the isolated flavonoid fraction, however less effective than the isolated tannic fraction, yet in relation to the control it obtained synergic action under all tested strains.

Whilst analyzing the cell viability curve of the fungi in relation to the fractions and FCZ in their different concentrations, it can be noticed in Fig. 3a, which shows the action of the compounds against CA 40006, that the isolated flavonoid fraction presented a low inhibition potential,

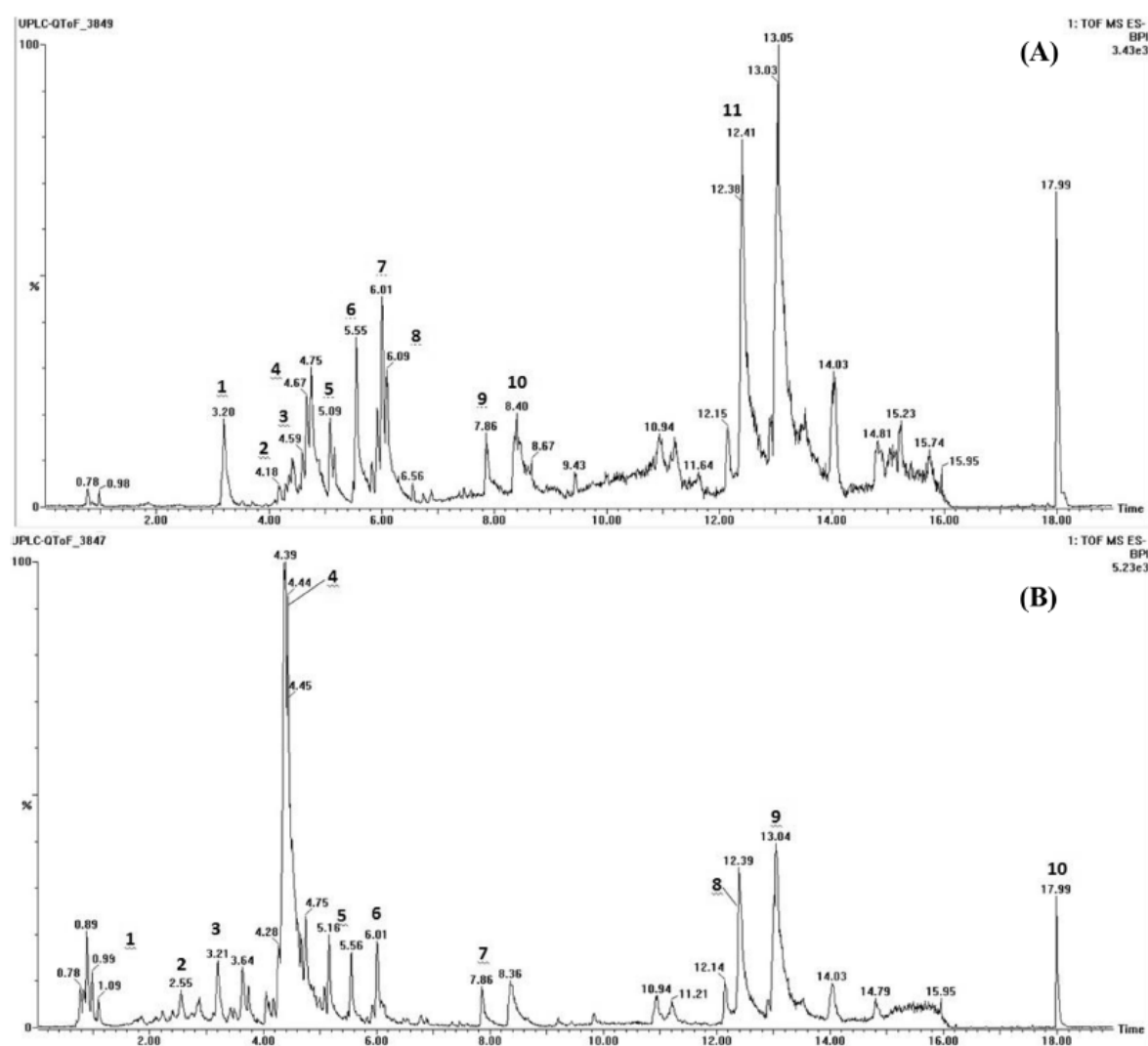


Fig. 1. Ultra-performance liquid chromatography with high definition mass spectrometry (UPLC-MS) chromatography of FFDLPG (A) and TFDLPG (B) in negative ionic mode.

albeit statistically significant to fluconazole, and can be seen at concentrations from 8 to 2048 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The tannic fraction obtained better inhibition potential than the control at concentrations from 128 to 1024 $\mu\text{g}/\text{mL}$, those values being associated with an IC_{50} of 69.29 $\mu\text{g}/\text{mL}$ revealed a promising antifungal potential against the tested strain. Regarding the association, they fractions acted synergistically at concentrations from 256 to 1024 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Fig. 3b shows the action of the compounds against CT 40042, it is perceived that the flavonoid fraction alone did not demonstrate a positive inhibitory effect by the curve, even at higher concentrations of 1024 and 2048 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no considerable inhibition was detected. The tannic fraction showed significant inhibition at concentrations from 256 to 1024 $\mu\text{g}/\text{mL}$, being more effective than fluconazole. The fractions together had a synergistic action at concentrations from 256 to 1024 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

As for the action of the compounds against CK 40095 in Fig. 3c, it is

possible to perceive similar results. The flavonoid fraction showed weak inhibitory activity with concentration values between 256 and 1024 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The tannic fraction against this strain showed an inverse action in relation to FCZ at the concentration of 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$, however the association of the fractions obtained a significant activity at the concentration of 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$, this being statistically significant in relation to Fluconazole, reaching total growth inhibition at 512 $\mu\text{g}/\text{mL}$, a clinically relevant value for a future drug as an alternative therapy for fungal infection treatments.

3.3. Fractions association with fluconazole: growth inhibition - cellular viability curve and IC_{50}

In Table 4 we have the IC_{50} of the Flavonoid and Tannic Fractions from dry *P. guajava* L. leaves tested in isolation, in combination with each other and in association with Fluconazole against *Candida* spp. to

Table 1
UPLC-ESI-QTOF-MS- identification of chemical constituents of the Flavonoid Fraction of Dried Leaves of *Psidium guajava*.

Peak no.	Rt Min	[M-H] ⁺ Observed	[M-H] ⁺ Calculated	Product Ions (MS/MS)	Empirical Formula	Ppm (error)	Putative Name	Reference
1	3.197	289,0705	289,0712	245,0787, 203,0714	C ₁₅ H ₁₃ O ₆	2.4	Catechin	(Díaz-de-Cerio et al., 2016)
2	4.293	300,9976	300,9984	229,9932	C ₁₄ H ₉ O ₈	2.7	Ellagic acid	(Díaz-de-Cerio et al., 2016)
3	4.596	433,0758	433,0771	301,0341	C ₂₀ H ₁₇ O ₁₁	3.0	Reynoutrin (quercetin-3-O-β-D-xylopyranoside)	(Díaz-de-Cerio et al., 2016)
4	4.674	433,0760	433,0771	301,0333	C ₂₀ H ₁₇ O ₁₁	2.5	Guajaverin	(Díaz-de-Cerio et al., 2016)
5	5.085	481,0970	481,0982	313,0562, 313,0562	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₃	2.5	Myrciaphenone B	(Díaz-de-Cerio et al., 2016)
6	5.550	571,1428	571,1452	313,0537, 257,0810, 169,0139	C ₂₈ H ₂₇ O ₁₃	4.2	Guavinoside B	(Díaz-de-Cerio et al., 2016)
7	6.005	557,1256	557,1236	---	C ₃₄ H ₂₁ O ₈	3.6	Not identified	(Díaz-de-Cerio et al., 2016)
8	6.089	301,0334	301,0348	178,9962, 151,0030	C ₁₃ H ₉ O ₇	4.7	Morin	(Díaz-de-Cerio et al., 2016)
9	7.860	501,3196	501,3275	---	C ₂₃ H ₄₉ O ₁₁	0.5	Not identified	
10	8.3373	503,3368	503,3373	---	C ₃₀ H ₄₇ O ₆	1.0	Not identified	
11	12.409	491,2423	491,2434	---	C ₃₀ H ₃₅ O ₆	2.2	Not identified	

The compounds were tentatively identified according to mass spectra and corresponding literature data. Peak no.: Peak number, Rt min: Retention time in minutes, [MH]⁺ - Observed: Mass observed in experiment, [MH]⁺ - Calculated: Mass calculated by software, Product Ions: Ionic product, Ppm, Putative name: Possible name.

analyze if the natural product potentiates the effect of the drug, if possible requiring a lower concentration of the drug. Values ranged from 1.57 to 925.56 µg/mL. The flavonoid fraction + FCZ demonstrated synergism with a significant reduction in concentration, compared to the control. The conjunction against CT reduced the drug concentration required 25-fold in all tested strains. The concentrations were lower than the control values, this being an important point for a future drug as a therapeutic alternative to the treatment of Candidiasis.

In relation to the tannic fraction + FCZ, in this test this conjunction was the one which exhibited the best result with a synergistic effect against all the strains tested, since the concentrations were reduced notably, where the lowest value of the test can be found against CK, a yeast known for its intrinsic resistance to FCZ, presenting with an IC₅₀ of 1.57 µg/mL. In other words the concentration needed, in relation to the control, fell by more than 100 times, where the natural product could have changed the mechanism of resistance of this strain thus allowing the drug to function.

Another aspect evidenced here are the concentrations of the tannic fraction + FCZ in relation to the other CA and CT strains, where,

between 2.22 and 2.49 µg/mL, respectively, the concentration decreased by 170 and 370 times, this being the most advantageous association of the test. In addition, another positive factor is that with the drop in concentration, this may consequently lead to a decrease in toxicity and possible side effects, taking into account the toxicity of most antifungal references. This natural product therefore holds active compounds, and is a potential candidate for development of adjuvant drugs, which after further experiments and in-depth studies could be used to treat fungal diseases. The association of the fractions with FCZ also obtained similar results to the previous ones, with a synergistic effect in all tested strains, as observed in Table 4.

When analyzing the curves in Fig. 3a, the action of the compounds in combination with Fluconazole against CA 40006 can be observed where, in this figure, all compounds were shown to be more effective than FCZ in isolation. The Flavonoid fraction showed mild synergism at the concentrations of 4 and 8 µg/mL, however their concentrations were very close to those of the control, this not being a very advantageous association. It was observed that the tannic fraction in association with FCZ, as well as the fractions in association with each other and

Table 2
UPLC-ESI-QTOF-MS- identification of chemical constituents of the Tannic Fraction Dried Leaves of *Psidium guajava*.

Peak no.	Rt Min	[M-H] ⁺ Observed	[M-H] ⁺ Calculated	Product Ions (MS/MS)	Empirical Formula	Ppm (error)	Putative Name	Referências
1	0.98	481,0635	481,0618	343,0571, 301,0002, 275,0254, 191,0127, 300,9976	C ₂₀ H ₁₇ O ₁₄	3.5	Not identified	
2	2558	933,0651	933,0634	300,9976	C ₄₁ H ₂₆ O ₂₆	1.8	Vescalagin/Castalagin Isomer	(Díaz-de-Cerio et al., 2016)
3	3206	289,0702	289,0712	245,0755, 125,0241	C ₁₅ H ₁₃ O ₆	3.5	Catechin	(Díaz-de-Cerio et al., 2016)
4	4438	301,0357	301,0348	178,9949, 151,0021	C ₁₃ H ₉ O ₇	3.0	Quercetin	(Díaz-de-Cerio et al., 2016)
5	5.136	585,0884	585,0880	433,0740, 301,0302, 169,0181	C ₂₇ H ₂₁ O ₁₅	0.7	Guavinoside C	(Díaz-de-Cerio et al., 2016)
6	6,00	557,1279	557,1295	169,0120, 243,0628, 313,0548	C ₂₇ H ₂₆ O ₁₃	2.9	2,6-dihydroxy-3-methyl-4-O-(6'-O-galloyl-β-D-glucopyranosyl)-benzophenone	(Díaz-de-Cerio et al., 2016)
7	7861	501,3220	501,3216	---	C ₃₀ H ₄₅ O ₆	0.6	Not identified	
8	12,2435	491,2435	491,2434	---	C ₃₀ H ₃₅ O ₆	0.2	Not identified	
9	13,043	491,2379	491,2375	---	C ₃₇ H ₃₁ O	0.8	(1S*,5S*)-2,2-Bis(biphenyl-4-yl)-5-indian-1-yltetrahydrofuran(V-81)	(Díaz-de-Cerio et al., 2016)
10	17.98	473,2340	473,2328	270,0552	C ₃₀ H ₃₃ O ₅	2.5	Not identified	Chang et al., 2013

The compounds were tentatively identified according to mass spectra and corresponding literature data. Peak no.: Peak number, Rt min: Retention time in minutes, [MH]⁺ - Observed: Mass observed in experiment, [MH]⁺ - Calculated: Mass calculated by software, Product Ions: Ionic product, Ppm, Putative name: Possible name.

Table 3
IC₅₀ (µg/mL) of the Flavonoid and Tannic Fractions of *P. guajava* L. Dry Leaves against *Candida* strains.

Strains	Fluconazole (FCZ)	FFDLPG	TFDLPG	FFDLPG + TFDLPG
CA INCQS 40006	378,8 ± 1,32	*2690,52 ± 3,18	*69,29 ± 1,89	*207,8 ± 4,28
CT INCQS 40042	925,56 ± 1,99	*3444,62 ± 3,47	*188,9 ± 2,59	*315,1 ± 4,41
CK INCQS 40095	163 ± 1,55	*1199,57 ± 3,66	*261,7 ± 3,25	*115,7 ± 2,58

FCZ: Fluconazole, FFDLPG: Flavonoid Fraction of Dried Leaves of *Psidium guajava*, TFDLPG: Tannic Fraction Dried Leaves of *Psidium guajava*; CA: *Candida albicans*; CT: *Candida tropicalis*; CK: *Candida krusei*; INCQS: National Institute of Quality Control in Health, *p ≤ 0.05 in relation to FCZ control.

with FCZ acted synergistically demonstrating a statistically significant potent inhibitory effect at concentrations from 2 to 1024 µg/mL. Still regarding the association of the fractions with FCZ, these obtained considerable values since they showed complete fungal growth inhibition in the concentration of 128 µg/mL. This value becomes important since this level of inhibition with a concentration ≤500 µg/mL is considered clinically relevant (Rosas et al., 2007), proving to be a probable and promising alternative against the tested fungus.

In Fig. 3b we observe the performance of the substances against CT, where all the associations acted synergistically, especially in the concentrations of 16–1024 µg/mL, especially for the tannic fraction which at concentrations of 2 and 8 µg/mL was shown as a potent inhibitor. This fact associated with an IC₅₀ of 2.49 µg/mL makes this conjunction a promising result.

In relation to CK (Fig. 3c), the tannic fraction showed a significant synergism in the range of 2–64 µg/mL. Moreover, the flavonoid fraction evidenced its synergistic and inhibitory potential at 128 µg/mL. Likewise, the association of the fractions with FCZ showed a considerable inhibitory potential, since at 256 µg/mL 100% fungal growth inhibition

was reached.

3.4. Minimum fungicide concentration: evaluation of the association of the individual fractions, in association with each other and in combination with fluconazole: fungicidal or fungistatic effect

The MFC of the fractions were considered the concentrations which caused an absence of colony growth. The values varied from 512 to ≥4096 µg/mL, where the fractions in their intrinsic activity through microdilution, presented a fungistatic effect, since they reduced yeast population in the assay, however these maintained values of 4096 µg/mL.

When investigating the potential of the fractions in association with Fluconazole, the majority remained with a fungistatic effect (4096 µg/mL), except for the Tannic fraction + FCZ against the CK 40095 strain, as they showed a fungicidal effect with values of 512 µg/mL. The Tannic + Flavonoid + FCZ combination against CK resulted in a fungicidal effect at 2048 µg/mL. For the fractions in association with each other and with FCZ, knowing that FCZ is a fungistatic antifungal, a

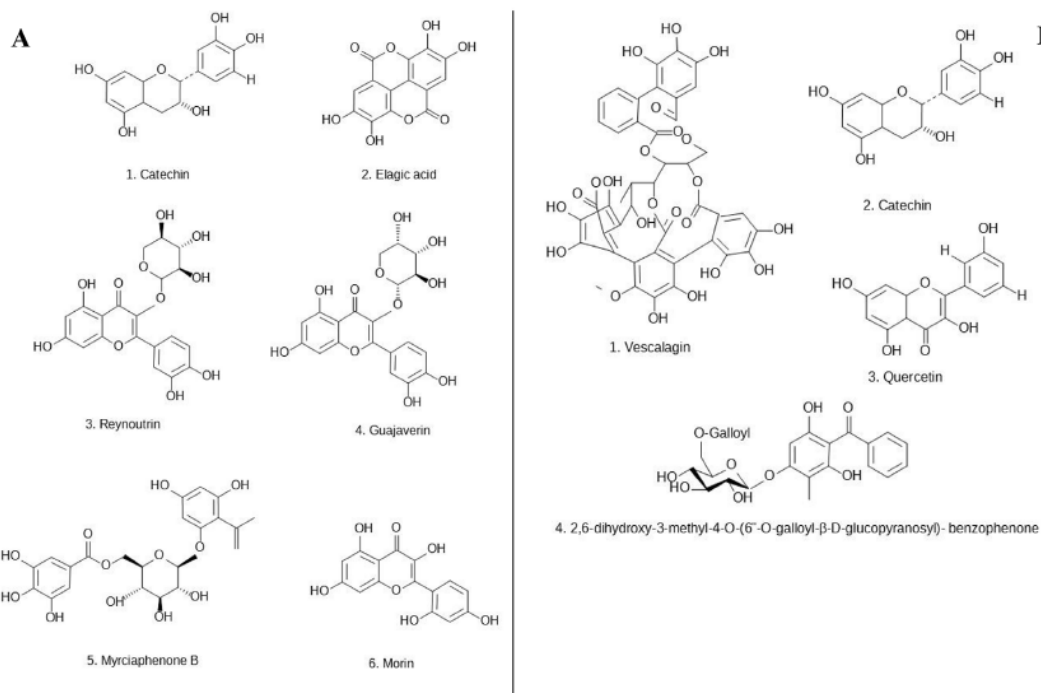


Fig. 2. Main structures corresponding to the identified compounds A: Flavonoid Fraction of Dried Leaves of *Psidium guajava* and B: Tannic Fraction of Dried Leaves of *Psidium guajava*.

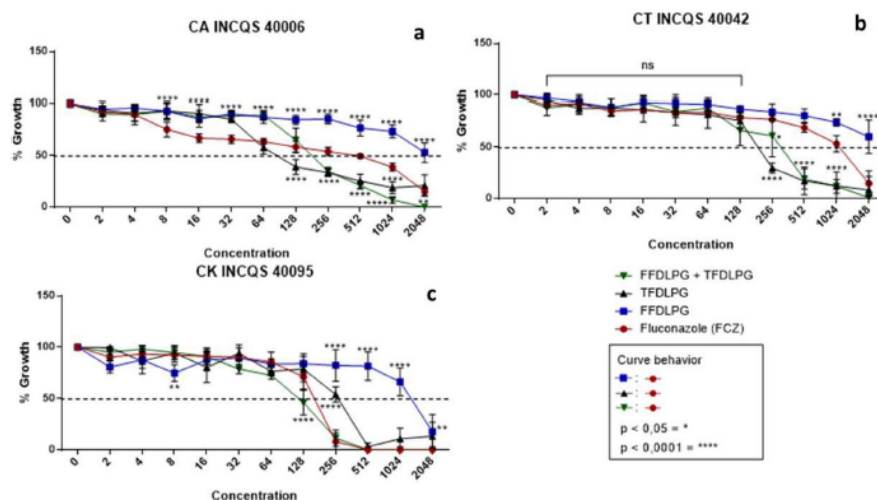


Fig. 3. Antifungal effect ($\mu\text{g/mL}$) of Flavonoid and Tannic Fractions of *P. guajava* L. Dried leaves, isolated and associated with Fluconazol as a control against *Candida* strains.

fungicidal action against the drug resistant strain in question, with possibly increased efficacy, occurred.

3.5. Fraction activity on fungal morphology: virulence control

In the micromorphological analysis different concentrations of the fractions were used: 512 (SCA/4), 2048 (SCA) and 4096 (SCAx2) $\mu\text{g/mL}$. These determined efficacy through altering and preventing fungal dimorphism of *C. albicans*, *C. krusei* and *C. tropicalis*, reducing and even inhibiting the manifestation of the virulence mechanism that is the process of filamentous structure formations, as their concentrations were increased.

In Fig. 4 we have examples of the photos taken during the assay, demonstrating growth control (Fig. 4A) where we observe and confirm the presence of virulence in the tested strains. In the second photo we have the beginning of regression of the filamentous structures (Fig. 4B), and in the consecutive photo we have the total hyphal inhibition (Fig. 4C).

From the readings and hyphal extension measurements the action of the Fractions and Fluconazole on the strains were noted in Fig. 5. In the first moment, a perceptible action against CA in the highest concentration tested, 4096 $\mu\text{g/mL}$, where inhibition was effective both for the Flavonoid fraction and the fractions in association was verified, acting even better than FCZ. However, the tannic fraction was not effective against the virulence factor, since even in the highest concentration the filaments appeared to be larger than the growth control. At 2048 and 512 $\mu\text{g/mL}$ concentrations a reduction of the structures occurred, however this was not effective enough to inhibit the

mechanism of virulence.

The effect against CT morphology in Fig. 6 shows inhibition by the Flavonoid fraction and the fractions in association as they prevented morphological transition at 4096 and 2048 $\mu\text{g/mL}$ concentrations. At the concentration of 512 $\mu\text{g/mL}$, the Flavonoid fraction significantly reduced the hyphae. The antifungal fluconazole, even in the highest concentrations did not inhibit the mechanism of virulence of the strains, only being able to reduce their quantity.

In relation to CK, the fractions and their association were able to prevent the species from exhibiting its virulence potential at the 4096 $\mu\text{g/mL}$ concentration, while the intermediate concentration a significant reduction in the dimorphism was observed. Fluconazole acted by reducing hyphae, however it was not able to prevent morphological transition.

From this test, the Flavonoid Fraction stands out by the fact that it prevented one of the fungal mechanisms of virulence, which is dimorphism, in the three species tested at the SCAx2 concentration.

4. Discussion

Guava is used in Brazil for the treatment of oral conditions, where both the leaves and peelings are used for the preparation of teas to be drunk whilst hot, with the intentions of fighting ulcers, which can be caused by *Candida* strains (Borba and Macedo, 2006; Oliveira et al., 2010; Sanda et al., 2011).

Flavonoids, such as naringenin, flavones and flavonol, including kaempferol, morin and quercetin, are part of an extensive group of secondary plant metabolites that have been described as having

Table 4
IC₅₀ ($\mu\text{g/mL}$) of Flavonoid and Tannic Fractions of *P. guajava* L. Dried Leaves associated with Fluconazole against *Candida* strains.

Strains	Fluconazole (FCZ)	FFDLPG + FCZ	TFDLPG + FCZ	FFDLPG + TFDLPG + FCZ
CA INCQS 40006	378,8 \pm 1,32	*176,59 \pm 3,34	*2,22 \pm 1,01	*3,75 \pm 0,01
CT INCQS 40042	925,56 \pm 1,99	*35,88 \pm 2,05	*2,49 \pm 7,16	*14,39 \pm 0,40
CK INCQS 40095	163 \pm 1,55	*77,3 \pm 2,86	*1,57 \pm 3,29	*86,88 \pm 1,31

FCZ: Fluconazole, FFDLPG: Flavonoid Fraction of Dried Leaves of *Psidium guajava*, TFDLPG: Tannic Fraction Dried Leaves of *Psidium guajava*; CA: *Candida albicans*; CT: *Candida tropicalis*; CK: *Candida krusei*; INCQS: National Institute of Quality Control in Health, *p \leq 0.05 in relation to FCZ control.

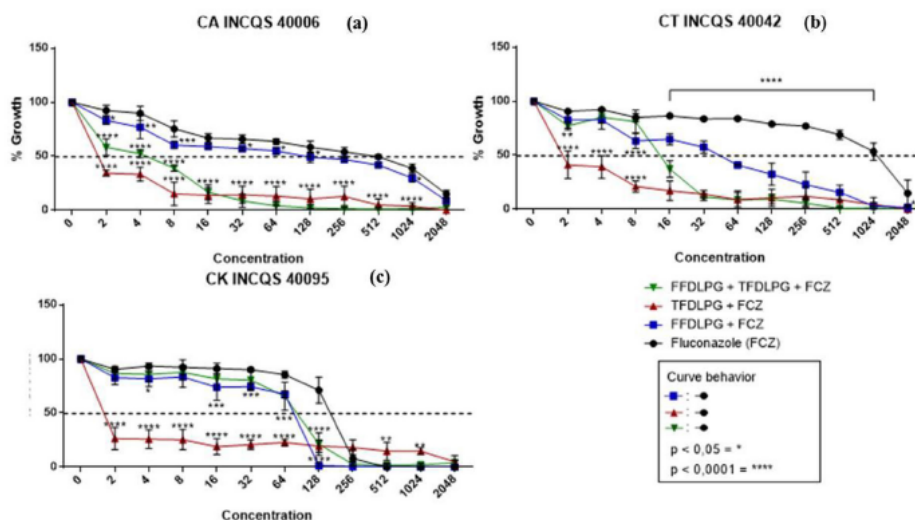


Fig. 4. Antifungal effect of Flavonoid and Tannic Fractions of *P. guajava* Dry Leaves isolated and associated with the standard antifungal in $\mu\text{g/mL}$.

antimicrobial and antioxidant activities (Rauha et al., 2000; Flores et al., 2013).

In the study by Shu et al. (2012), chromatographies of the *P. guajava* L. leaf extract were carried out and the following constituents were found: a diphenylmethane, a benzophenone and eight flavonoids, respectively, were isolated and elucidated as 2,6-dihydroxy-3-formaldehyde-5-methyl-4-*O*-(6-*O*-galloyl-*D*-glucopyranosyl)-diphenylmethane, 2,6-dihydroxy-3,5-dimethyl-4-*O*-(6-*O*-galloyl-*D*-glucopyranosyl)-benzophenone, kaempferol, quercetin, quercitrin, isoquercitrin, gajaiverin, avicularin, hyperoside and reynoutrine. From these, four metabolites coincide with those found in our study, as can be seen in Tables 1 and 2, such as 2,6-dihydroxy-3,5-dimethyl-4-*O*-(6-*O*-galloyl-*D*-glucopyranosyl)-benzophenone, quercetin, gajaiverin and reynoutrine.

In the study by Chang et al. (2013), chemical analyzes of guava leaves found principal constituents, among them, quercetin, myricetin, catechin, gallic and ellagic acid and their derivatives, corroborating with our study where we also found some of these compounds, as can be seen in Tables 2 and 3 Gallic acid, catechin, epicatechin, rutin, quercetin, naringenin and kaempferol, were also found in guava leaves in the study by Chen et al. (2010), some have antioxidant activity (Alvarez-Suarez et al., 2018).

One of the problems faced is resistance to antifungal drugs, both intrinsic and acquired, which usually occurs among all these species in several classes of the antifungal drugs (Day et al., 2013). In addition, the increasing use of antifungal drugs from the azole class, both for

preventive use and for treating active infections, increased the prevalence of fluconazole-resistant candidoses in the United States annually by > 3,400, as certified by the Center for Disease Control and Prevention thus framing fluconazole-resistant *Candida* as a seric threat, this reaching the same threat level as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) (CDC, 2013).

The drug fluconazole, used in these experiments, acts by inhibiting the biosynthesis pathway of the major fungal cell membrane component, ergosterol. Consequently, fluconazole inhibits the enzyme lanosterol 14- α -demethylase in the cytochrome P-450 enzyme system of fungi, which is encoded by the ERG11 gene. Thus, lanosterol can not be converted to ergosterol and consequently the accumulation of precursors occurs causing instability in the fungal membrane (Carril Muñoz et al., 2006).

Therapy to combat fungal infections, particularly in the immunocompromised patient population, is a challenging task, therefore, there is an immediate need for new antifungal drugs that overcome resistance and decrease the side effects associated with high drug doses (Calabrese et al., 2013). The association of drugs which achieve synergistic results generates, as an effect of this interactive efficacy elevation of the therapeutic effect, a decrease in minimum inhibitory concentration, regression of antibiotic resistance development and a decrease in host toxicity. Therefore, the use of substances association has been widely researched and used as alternatives for the treatment of infections (Karla Monik et al., 2015).

Beatriz et al. (2012) in their research reported the activity of

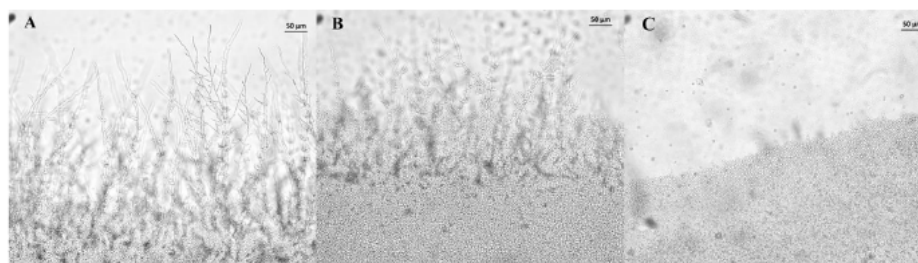


Fig. 5. Demonstration of the progressive reduction of filamentous structures.

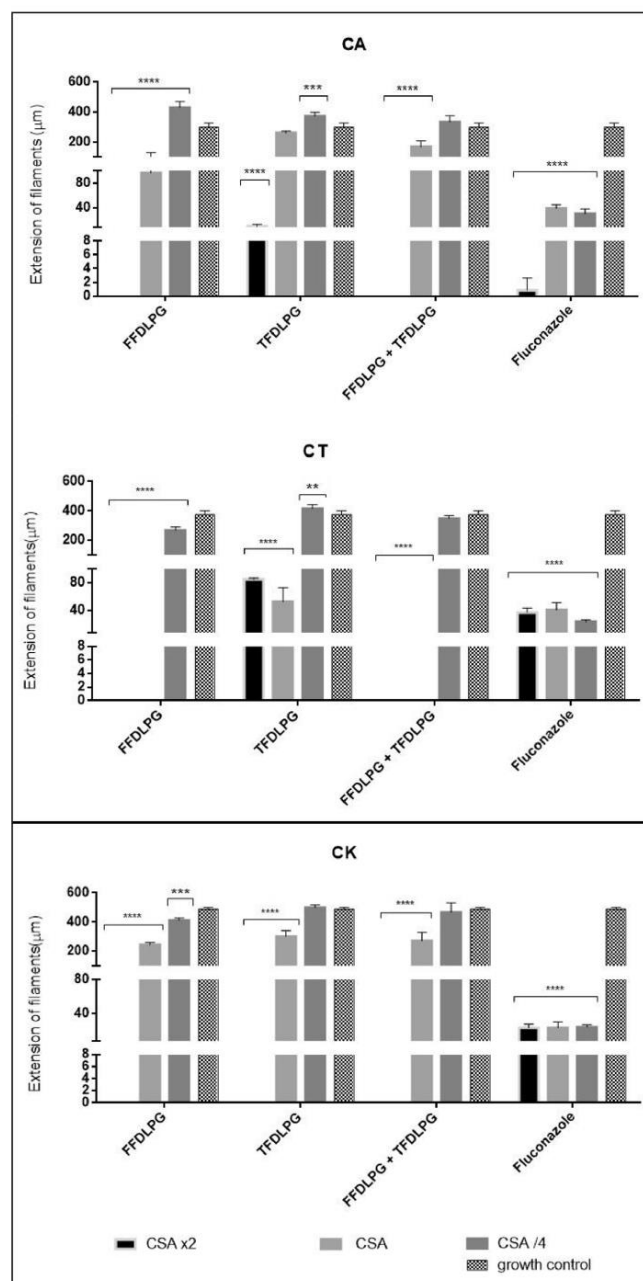


Fig. 6. Measurement of the hyphae extension under the action of the fractions: Flavonoid and Tánica of Dry Leaves of *P. guajava* against *C. albicans*, *C. tropicalis* and *C. krusei*.

guajava leaf extracts (50 mg/mL) against various fungi. The hexane extract had an effect against all strains, among them were *C. albicans* and *C. parapsilosis*, whereas the methanolic and acetone extracts were active for 70% of them. The inhibition zones varied between 10 and 19 mm.

Morais-Braga et al. (2017) in their study evaluated the action of *P. guajava* L. extracts against *C. albicans* and *C. tropicalis* resulting in a MIC of the products in this study determined as 8192 µg/mL in which a marked reduction in the percentage of viable microorganisms was observed. The results from the Minimal Fungicide Concentration showed that, at the concentrations tested, no extract showed a fungicidal effect (> 8192 µg/mL).

In the study by Egharevba et al. (2010) the potential of hydro-methanolic, methanolic, ethyl acetate and hexane extracts from *P. guajava* leaves against *C. albicans* ATCC and isolates were investigated. In the diffusion test using the 10 mg/mL and 20 mg/mL (hexane) concentrations, halos varying from 15 to 30 mm were formed, while in the broth dilution test the MIC varied from 1.25 to 10 mg/mL, with emphasis on the methanolic extract, corroborating with our work.

In the study by Machado et al. (2016) the antifungal activity from leaf fractions of one regional guava type, *Acca sellowiana* (O.berg) Burret, from the same *P. guajava* family (Myrtaceae), were tested against 19 non-*albicans* *Candida* clinical isolates species, among them were *C. tropicalis* and *C. krusei*, presenting with a MIC of 8 and \geq 500 µg/mL against *C. tropicalis* and *C. krusei*, respectively.

Using 20 µL of a *P. guajava* L. hydroethanolic extract (70%), Fonseca and Botelho (2010) observed growth inhibition of *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida krusei* strains, with inhibition zones of 14, 11 and 10 mm, respectively. Another investigation with the aqueous, ethanolic and acetone extracts from the leaves had an effect on *C. albicans*, *C. krusei*, *Candida glabrata* and *Candida dubliniensis* yeasts with MICs ranging from 15, 62–250 µg/mL (Assunçedil et al., 2013).

Some phenolic compounds such as gallic acid, catechin, luteolin and quercetin demonstrated *in vitro* antifungal potential against different *Candida* species, including *C. albicans* and *C. tropicalis* in the study carried out by Alves et al. (2014), a fact which is in line with our study. da Silva et al. (2014) evaluated flavonoid interactions (catechin, quercetin and epigallocatechin), using *in vitro* microdilution, associated with fluconazole against fluconazole resistant *C. tropicalis*, where it was possible to observe a considerable synergistic antifungal effect in the study, reducing MICs of isolated flavonoids from 64 µg/mL up to 0.25 µg/mL, corroborating with our study, since the same flavonoids were found in the present study.

Other isolated compounds, also detected in this chemical analysis, showed antifungal activity. Quercetin and Guajaverina were tested by microdilution against *C. albicans* ATCC 90028, presenting an antifungal activity with MIC > 128 µg/mL (da Silva Sá et al., 2017). Kaempferol, Myricaphenone B and Quercetin showed inhibitory activity against *C. albicans* strains resulting in a MIC of 200 µg/mL (De Leo et al., 2004). Ochoa-Pacheco et al. (2017) verified the antifungal potential of ellagic acid isolated on *Candida* spp. where the component was active against *C. krusei* with an IC₅₀ of 128 µg/mL and inactive against *C. albicans* and *C. tropicalis*, MIC > 2048 µg/mL.

In the study by Morais-Braga et al. (2016), when evaluating the modifying effect of aqueous and hydroethanolic extracts from the leaves of species of the genus *Psidium*, among which *P. guajava* L. was included, in association with Fluconazol against *C. albicans* and *C. tropicalis* synergistic extracts/antifungal relationships were observed.

The *P. guajava* extract activity on fungal morphology was reported by Morais-Braga et al. (2017) at concentrations of 4,096, 8192 and 16,384 µg/mL which showed that they were able to alter *C. albicans* and *C. tropicalis* dimorphism by decreasing hyphae and pseudohyphae at increasing concentrations.

Canonico et al. (2014) evaluated the antimicrobial activity of the flavonoids, quercetin, luteolin, kaempferol, fisetin, isorhamnetina, acacetin, chrysin, apigenin, galangina and tamarixetina present in

honey extract, among which the tested microorganisms was *Candida* spp. As a result it was perceptible that phenolic compounds had a potential for inhibiting yeast morphological transition, preventing the development of possible phenotypes exhibited by *C. albicans* due to damage to the membrane integrity, thus morphological transition of hyphae was reduced and consequently infection was reduced.

5. Conclusion

In this study, the flavonoid and tannic fractions from dried *P. guajava* L. leaves presented a relevant antifungal capacity. The fractions presented in their composition mainly phenolic compounds with antifungal effect previously evidenced which may have contributed to the isolated and synergistic activity of the tests. The fractions inhibited *Candida* spp., colonies with emphasis on the Tannic fraction, since its action both in isolated use and in association obtained a synergistic and fungicidal effect. The Flavonoid fraction inhibited colony formation, however its effect was revealed as fungistatic. One of the best activities in this study was the combination between natural product and antifungal drug as it potentiated the action of the antifungal (Fluconazol), reducing its concentration and increasing its effectiveness. The association regressed and affected a key factor of fungal virulence that is dimorphism. These results show that these fractions may be considered as possible sources of antifungal agents, however, more indepth studies are needed to identify the active compounds and to prove their efficacy, safety and mechanism of action.

Transparency document

Transparency document related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2018.05.021>.

References

- Alvarez-Suarez, J.M., et al., 2018. Guava (*Psidium guajava* L. cv. Red Suprema) crude extract protect human dermal fibroblasts against cytotoxic damage mediated by oxidative stress. *Plant Foods Hum. Nutr.* 73 (1), 18–24.
- Alves, C.T., Ferreira, I.C., Barros, L., Silva, S., Azeredo, J., Henriques, M., 2014. Antifungal activity of phenolic compounds identified in flowers from North Eastern Portugal against *Candida* species. *Future Microbiol.* 9 (2), 139–146.
- Arendrup, M.C., 2010. Epidemiology of invasive candidiasis. *Curr. Opin. Crit. Care* 16, 445–452.
- Assunçedil, M.R., Santiago, R.R., Langassner, S.M.Z., Svidzinski, T.I.E., Soares, L.A.L., 2013. Antifungal activity of medicinal plants from Northeastern Brazil. *J. Med. Plants Res.* 7 (40), 3008–3013.
- Barbosa, W.L.R., Quignard, E., Tavares, I.C.C., Pinto, L.N., Oliveira, F.Q., Oliveira, R.M., 2004. Handbook to Phytochemical and Chromatographic Analysis of Plant Extracts. vol.4. Revista Científica da UFPA, Belém-PA, pp. 1–15 2004.
- Beatriz, P.M., Ezequiel, V.V., Flar, C.R., 2012. Antifungal activity of *Psidium guajava* organic extracts against dermatophytic fungi. *J. Med. Plants Res.* 6 (41), 5435–5438.
- Borba, A.M., Macedo, M., 2006. Plantas medicinais usadas para a saúde bucal pela comunidade do bairro Santa Cruz, Chapada dos Guimarães, MT, Brasil. *Acta Bot. Bras.* 20, 771–782.
- Calabrese, E.C., Castellano, S., Santoriello, M., Sgheri, C., Quartacci, M.F., Calucci, L., et al., 2013. Antifungal activity of azole compounds CPA18 and CPA109 against azole-susceptible and resistant strains of *Candida albicans*. *J. Antimicrob. Chemother.* 68, 1111–1119.
- Calderone, R.A., 2002. Introduction and historical perspectives. In: Calderone, R.A. (Ed.), *Candida and Candidiasis*. ASM Press, Washington DC, USA, pp. 15–25.
- Camacho-Hernández, I.L., Cisneros-Rodríguez, C., Uribe-Beltrán, M.J., Ríos-Morgan, A., Delgado-Vargas, F., 2004. Antifungal activity of fruit pulp extract from *Psidium sartorianum*. *Fitoterapia* 75 (3–4), 401–404.
- Canonico, B., Candiracci, M., Citterio, B., Curci, R., Squarzone, S., Mazzoni, A., et al., 2014. Honey flavonoids inhibit *Candida albicans* morphogenesis by affecting DNA behavior and mitochondrial function. *Future Microbiol.* 9 (4), 445–456.
- Carrillo-Muñoz, A.J., et al., 2006. Antifungal agents: mode of action in yeast cells. *Rev. Esp. Quimioter.* 19 (2), 130–139.
- CDC, 2013. Antibiotic Resistance Threats in the United States. Atlanta, GA.
- Chang, C.H., Hsieh, C.L., Wang, H.E., Peng, C.C., Chyaua, C.C.M e, Penga, R.Y., 2013. Unique bioactive polyphenolic profile of guava (*Psidium guajava*) budding leaf tea is related to plant biochemistry of budding leaves in early dawn. *J. Sci. Food Agric.* 93 (4), 944–954.
- Chen, Kuan-Chou, Chuang, Chao-Ming, Lin, Li-Yun, Chiu, Wen-Ta, Wang, Hui-Er, Hsieh, Chiu-Lan, Tsai, Tsuimin, Peng, Robert Y., 2010. The polyphenolics in the aqueous extract of *Psidium guajava* kinetically reveal an inhibition model on LDL glycation.

- Pharmaceut. Biol. 48 (1), 23–31. <http://dx.doi.org/10.3109/13880200903029365>.
- Coutinho, H.D.M., Costa, J.G.M., Lima, E.O., Falcão-Silva, V.S., Siqueira-Júnior, J.P., 2008. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and Chlorpromazine. *Chemotherapy* 54 (4), 328–330.
- da Silva, C.R., de Andrade Neto, J.B., de Sousa Campos, R., Figueiredo, N.S., Sampaio, L.S., Magalhães, H.I.F., et al., 2014. Synergistic effect of the flavonoid catechin, quercetin, or epigallocatechin gallate with fluconazole induces apoptosis in *Candida tropicalis* resistant to fluconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58 (3), 1468–1478.
- da Silva Sá, F.A., de Paula, J.A.M., dos Santos, P.A., de Almeida Ribeiro Oliveira, L., de Almeida Ribeiro Oliveira, G., Liao, L.M., et al., 2017. Phytochemical analysis and antimicrobial activity of *Myrcia tomentosa* (aubl.) DC. *Leaves. Molecules* 22 (7), 1100.
- Day, J.N., Chau, T.T., Wolbers, M., Mai, P.P., Dung, N.T., Mai, N.H., et al., 2013. Combination antifungal therapy for cryptococcal meningitis. *N. Engl. J. Med.* 368 (14), 1291–1302.
- De Leo, M., Braca, A., De Tommasi, N., Norscia, I., Morelli, I., Battinelli, L., Mazzanti, G., 2004. Phenolic compounds from *Baseonema acuminatum* leaves: isolation and antimicrobial activity. *Planta Med.* 70 (09), 841–846.
- Diaz-de-Cerio, E., Gómez-Caravaca, A.M., Verardo, V., Fernández-Gutiérrez, A., Segura-Carretero, A., 2016. Determination of guava (*Psidium guajava* L.) leaf phenolic compounds using HPLC-DAD-QTOF-MS. *J. Funct. Foods* 22, 376–388.
- Egharevba, H.O., Iliya, I., Ibeke, N., Abdullahi, M.S., Okwute, S.K., Okogun, J.I., 2010. Broad spectrum antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. *Leaf. Nat. Sci.* 8, 43–50.
- Ernst, E.J., Klepser, M.E., Ernst, M.E., Messer, S.A., Pfäller, M.A., 1999. *In vitro* pharmacodynamic properties of MK-0991 determined by time-kill methods. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 33, 75–80.
- Flores, G., Dastmalchi, K., Wu, S.B., Whalen, K., Dabo, A.J., Reynertson, K.A., et al., 2013. Phenolic-rich extract from the Costa Rican guava (*Psidium friedrichsthalianum*) pulp with antioxidant and anti-inflammatory activity. Potential for COPD therapy. *Food Chem.* 141 (2), 889–895.
- Fonseca, J.F., Botelho, A.C.F., 2010. Atividade antifúngica do extrato de folhas de *Psidium guajava* sobre leveduras do gênero *Candida*. *Rev. Fac. Odontol. Porto Alegre* 51 (1), 24–26.
- Gow, N.A., van de Veerdonk, F.L., Brown, A.J., Netea, M.G., 2011. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 112–122.
- Javadpour, M.M., Juban, M.M., Lo, W.C., Bishop, S.M., Alberty, J.B., Cowell, S.M., Becker, C.L., McLaughlin, M.L., 1996. Against antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. *J. Med. Chem.* 39, 107–3113.
- Calixto Júnior, J.T., Morais, S.M., Martins, C.G., Vieira, L.G., Morais-Braga, M.F.B., Carneiro, J.N., et al., 2015. Phytochemical analysis and modulation of antibiotic activity by *Luehea paniculata* Mart. & Zucc. (Malvaceae) in multiresistant clinical isolates of *Candida* spp. *BioMed Res. Int.* 2015.
- Karla Monik, A., Thiago, P., Ravelly, L., Deysiane, O., Felipe Hugo, A., Fernando José, L., et al., 2015. Modulation of the erythromycin resistance in *Staphylococcus aureus* by ethanolic extracts of *Ximena americana* L. and *Schinopsis brasiliensis* Engl. *Bol. Latinoam. Caribe Plantas Med. Aromat. (BLACPMA)* 14 (2).
- Köhler, J.R., Casadevall, A., Perfect, J., 2015. The spectrum of fungi that infects humans. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 5 (1) a019273.
- Ksouri, S., Djebir, S., Bentorki, A.A., Gouri, A., Hadeif, Y., Benakhlá, A., 2017. Antifungal activity of essential oils extract from *Origanum floribundum* Munby, *Rosmarinus officinalis* L. and *Thymus ciliatus* Desf. against *Candida albicans* isolated from bovine clinical mastitis. *J. Mycol. Med.* 27, 245–259.
- Lapenna, E.A., Medina Ramírez, G.E., Díaz, L., Aguillón, K., Marín, H., 2003. Actividad bactericida y fungicida de algunas plantas utilizadas en la medicina tradicional venezolana. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel* 34 (1), 6–9.
- Machado, Gabriella da R.M., Pippi, Bruna, Dalla Lana, Daiane Flores, Amaral, Ana Paula S., Teixeira, Mário Lettieri, de Souza, Kellen C.B., Fuentesria, Alexandre M., 2016. Reversal of fluconazole resistance induced by a synergistic effect with *Acca sellowiana* in *Candida glabrata* strains. *Pharmaceut. Biol.* <http://dx.doi.org/10.3109/13880209.2016.1158286>.
- Mendes, J.M., 2011. Investigação da atividade antifúngica do óleo essencial de *Eugenia caryophyllata* Thunb. sobre cepas de *Candida tropicalis*. In: *Dissertação de Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos*. Universidade Federal da Paraíba – UFPB, João Pessoa – PB.
- Morais-Braga, M.F.B., Cameiro, J.N.P., Machado, A.J.T., dos Santos, A.T.L., Sales, D.L., Lima, L.F., Coutinho, H.D.M., 2016. *Psidium guajava* L., from ethnobiology to scientific evaluation: elucidating bioactivity against pathogenic microorganisms. *J. Ethnopharmacol.* 194, 1140–1152.
- Morais-Braga, M.F., Cameiro, J.N., Machado, A.J., Sales, D.L., dos Santos, A.T., Boligon, A.A., et al., 2017. Phenolic composition and medicinal usage of *Psidium guajava* Linn.: antifungal activity or inhibition of virulence? *Saudi J. Biol. Sci.* 24 (2), 302–313.
- Ochoa-Pacheco, A., Arranz, J.C.E., Beaven, M., Peres-Roses, R., Gámez, Y.M., Camacho-Pozo, M.I., et al., 2017. Bioassay-guided *in vitro* study of the antimicrobial and cytotoxic properties of the leaves from *Excoecaria lucida* Sw. *Pharmacogn. Res.* 9 (4), 396.
- Oliveira, D.A., Sobral, M.E.G., Duarte, M.G.R., Fonseca, J.F., França-Botelho, A.C., 2010. Atividade antifúngica do extrato de folhas de *Psidium guajava* sobre leveduras do gênero *Candida*. *Rev. Fac. Odontol. Porto Alegre* 51, 24–26.
- Paramythiotou, E., Frantzeskaki, F., Flevari, A., Armaganidis, A., Dimopoulos, G., 2014. Invasive fungal infections in the ICU: how to approach, how to treat. *Molecules* 19, 1085–1119.
- Paul, S., Moye-Rowley, W.S., 2014. Multidrug resistance in fungi: regulation of transporter-encoding gene expression. *Front. Physiol.* 5, 143.
- Pfaller, M.A., Diekema, D.J., 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 133–163.
- Rauha, J.P., Remes, S., Heinonen, M., Hoppa, A., Kahkonen, M., Kujala, T., Pihlaja, K., Vuorela, H., Vuorela, P., 2000. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *Int. J. Food Microbiol.* 56, 3–12.
- Rekha, S., Vidyasagar, G.M., 2014. Anti-*Candida* Activity of Medicinal Plants. (A review). *Rosas, L.V., Cordeiro, M.S.C., Campos, F.R., Nascimento, S.K.R., Januário, A.H., França, S.C., Nomizo, A., Toldo, M.P., Albuquerque, S., Pereira, P.S., 2007. In vitro evaluation of the cytotoxic and trypanocidal activities of *Ampelopsis vinifera* (Rhamnaceae). *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2007 (40), 663–670.*
- Sanda, K.A., Grema, H.A., Geidam, Y.A., Bukar-Kolo, Y.M., 2011. Pharmacological aspects of *Psidium guajava*: an update. *Int. J. Pharmacol.* 7 (3), 316–324.
- Shankar, J., Solis, N.V., Mounaud, S., Szpakowski, S., Liu, H., Losada, L., et al., 2015. Using Bayesian modelling to investigate factors governing antibiotic-induced *Candida albicans* colonization of the GI tract. *Sci. Rep.* 5, 8131.
- Shu, Ji-Cheng, Chou, Gui-Xin, Wang, Zheng-Tao, 2012. One new diphenylmethane glycoside from the leaves of *Psidium guajava* L. *Nat. Prod. Res.: Formerly Nat. Prod. Lett.* 26 (21), 1971–1975.
- Sidrin, J.J.C., Rocha, M.F.G., 2010. *Micologia médica à luz de autores contemporâneos*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 388.
- Singh, M., Kumar, M., Kalaivani, R., Manikandan, S., Kumaraguru, A.K., 2013. Metallic silver nanoparticle: a therapeutic agent in combination with antifungal drug against human fungal pathogen. *Bioproc. Biosyst. Eng.* 36 (4), 407–415.
- Soll, D.R., 2002. *Candida* commensalism and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. *Acta Trop.* 81 (2), 101–110.
- Stoppa, M.A., Casemiro, I.A., Vinholis, A.H.C., Cunha, W.R., Silva, M.L.A., Martins, C.H.G., Furtado, N.A.J.C., 2009. Estudo comparativo entre as metodologias preconizadas pelo CLSI e pelo EUCAST para avaliação da atividade antifúngica. *Quim. Nova* 32, 498–502 [online].
- Suwanmanee, S., Kitisin, T., Luplertop, N., 2014. *In vitro* screening of 10 edible Thai plants for potential antifungal properties. *Evid. base Compl. Alternative Med.* 2014.
- Terrill, T.H., Rowan, A.M., Douglas, G.B., Barry, T.N., 1992. Determination of extractable and bound condensed tannin concentration in forage plants, protein concentrate meals and cereal grains. *J. Sci. Food Agric.* 58 (3), 321–329 London.
- Wen, L., Haddad, M., Fernández, I., Espinoza, G., Ruiz, C., Neyra, E., et al., 2011. Actividad antifúngica de cuatro plantas usadas en la medicina tradicional peruana: aislamiento de 3'-formil-2', 4', 6'-trihidroxidihidrochalcona, principio activo de *Psidium acutangulum*. *Revista de la Sociedad Química del Perú* 77 (3), 199–204.
- Williams, D., Lewis, M., 2011. Pathogenesis and treatment of oral candidiasis. *J. Oral Microbiol.* 3, 5771. <http://dx.doi.org/10.3402/jom.v3i0.5771>.
- Zida, A., Bamba, S., Yacouba, A., Ouedraogo-Traore, R., Guiguemde, R.T., 2017. Anti-*Candida albicans* natural products, sources of new antifungal drugs: a review. *J. Mycol. Med.* 27, 1–19.

Further reading

Lopez-Martinez, R., 2010. Candidiasis, a new challenge. *Clin. Dermatol.* 28, 178–184.

6. CONCLUSÃO

As frações flavonoídica e tânica das folhas frescas e secas de *P. guajava* tiveram seu potencial antifúngico revelado frente a *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei*;

As frações apresentaram em sua composição, como era esperado, compostos fenólicos, alguns com efeito antifúngico já evidenciado que podem ter contribuído para o efeito sinérgico dos testes;

Quercetina, Galocatequina, Ácido elágico, Reynoutrina e Guavinoside foram compostos fenólicos comuns entre as frações tanto em folhas secas e frescas;

A fração Tânica de folhas frescas e secas apresentou uma atividade destacada em relação às demais, tanto em sua atividade intrínseca, como em associação, com enfoque para a última principalmente frente a *C. albicans* e *C. tropicalis*.

A associação das frações para verificar a atividade intrínseca se mostraram mais eficazes que a Fração Flavonoídica isolada, pois reduziram a concentração necessária para inibir 50% das colônias;

A atividade frente à inibição da formação de colônias (CFM) demonstrou um efeito fungistático, devido a redução das colônias em todas as cepas;

O potencial de inibição com melhor atividade foi a junção das frações com o fármaco, pois expressaram um efeito sinérgico, com a potencialização da ação do antifúngico de referência (Fluconazol), reduzindo sua concentração e aumentando a efetividade frente a todas as cepas testadas, com destaque, mais uma vez, para a fração Tânica;

As frações inibiram a ocorrência de um importante fator de virulência fúngica, a transição morfológica de leveduras para hifas e pseudo-hifas;

Esses resultados mostram que estas frações possuem constituintes ativos antifúngicos, no entanto são necessários estudos mais aprofundados no intuito de comprovar a efetividade e a segurança, de fato esses resultados faz desse produto natural uma possível alternativa para uma nova droga ou coadjuvante ao tratamento das patologias fúngicas.

Estudos adicionais usando modelos animais são necessários para verificar a eficácia *in vivo* das mesmas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRA, M.F.; et al., **Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil**. Revista Brasileira de Farmacognosia, v.18, n.3, p.472-508, 2008.

AHMED, A., et al., **Invasive candidiasis in non neutropenic critically ill - need for region-specific management guidelines**. Indian Journal of Critical Care Medicine, 19(6), 333. (2015). doi:10.4103/0972-5229.158273

ALCAZAR-FUOLI, L.; MELLADO, E., **Current status of antifungal resistance and its impact on clinical practice**. British Journal of Haematology, 166(4), (2014). 471–484. doi:10.1111/bjh.12896

ALENCAR, L.C. B., **Avaliação de Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais do Gênero *Spondias***. Universidade Estadual da Paraíba. Campina Grande. 2014.

ÁLVARES, C. A., et al. **Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras**, Journal Bras Patol Med Lab ,v. 43, n. 5, p. 319-327, 2007.

ATANASOV, A. G.; et al., **Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review**. Biotechnology Advances, v. 33, p. 1582-614, 2015

AUDI, E.A., et al. **Gastric antiulcerogenic effects of *Stryphnodendron adstringens* in rats**. Phyther Res 13:264–6.,1999;

AUDI, E.A., et al., **Biological activity and quality control of extract and stem bark from *Stryphnodendron adstringens***. Acta Farm Bonaer. 23:328–33, 2004;

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

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

BARBEDO, L. S., SGARBI, D. B. G. **Candidíase**. Jornal Brasileiro de doenças sexualmente transmissíveis, v. 7, n. 12, p. 51- 60, 2010;

BARBOSA, W.L.R., et al., **Manual para análise fotoquímica e cromatografia de extratos vegetais, Bélem-PA**: Revista Científica da UFPA, vol.4.2001., 2004
Disponível em <http://www.ufpa.br/rcientifica>.

BARBOSA-FILHO, J. M.; et al., **Natural products with antileprotic activity**. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 17, n. 1, p. 141-148, 2007.

BARROSO, G.M. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Universidade Federal de Viçosa, v. 2, 1991.

BERG, J.M.T.; LUBERT, J. **Bioquímica**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 545p. 2008.

BEECHER G.R., **Overview of Dietary Flavonoids: Nomenclature, Occurrence and Intake**. The Journal of Nutrition, pp. 3248S – 3254S. (2003).

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

BRANDÃO, H. N.; et al., **Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas**. Química Nova, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.

BRUDER-NASCIMENTO, A., et al., **Species distribution and susceptibility profile of *Candida* species in a Brazilian public tertiary hospital**. BMC research notes, v. 3, n. 1, p. 1, 2010.

BRUNETON, J.; **Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia**, Ed. Acribia, SA: Espanha, 1991.

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

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

CARVALHO, M. Z.; **Abordagem multivariada do comportamento das propriedades físico-químicas e caracterização de adesivos naturais à base de Taninos**. Universidade Federal de Lavras, Programa de Pós- Graduação em Agroquímica, Minas Gerais, 2016.

CASSONE, A., **Vulvovaginal *Candida albicans* infections: pathogenesis, immunity and vaccine prospects**. BJOG An Int. J. Obstet. Gynaecol. 122, 785–794, 2015.

CASTEJON, F. V., **Taninos e Saponinas**, UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS, 2011.

CHAMPE, P.; HARVEY, R. **Biochemistry**. Lippincott's Illustrated Reviews 4th ed. 2008.

CHUNG, P. Y.; NAVARATNAM, P.; CHUNG, L. Y. **Synergistic antimicrobial activity between pentacyclic triterpenoids and antibiotics against *Staphylococcus aureus* strains**. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, v. 10, n. 25, p. 10, 25-31, 2011;

COLLI, A, et al., **Propriedades físico-mecânicas e preservação, com boro e tanino, do *Bambusa tuldoides* (Munro)**. Floresta e Ambiente 14(1): 56-64, 2007;

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

COUTINHO, H.D.M., et al., **Enhancement of the Antibiotic Activity against a Multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and Chlorpromazine**. Chemotherapy, Karger, 54:328–330. Doi: 10.1159/000151267; 2008;

CUENCA-ESTRELLA, M., **Antifúngicos en el tratamiento de las infecciones sistémicas: Importancia del mecanismo de acción, espectro de actividad y resistencias**. Revista Espanola de Quimioterapia, 23(4), 169–176, (2010).

CUSHNIE, T.P.T., LAMB, A.J., **Antimicrobial activity of flavonoids**. Int J Antimicrob Agents 26: 343-356, 2005

DE JESUS, N.Z.T.; et al., **Levantamento etnobotânico de plantas popularmente utilizadas como antiúlceras e antiinflamatórias pela comunidade de Pirizal, Nossa Senhora do Livramento - MT, Brasil**. Revista Brasileira de Farmacognosia, v.19, n.1A, p.130-139, 2009

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

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

ERNST, E.J. et al. **In vitro pharmacodynamic properties of MK-0991 determined by time-kill methods.** Diagnostic microbiology and infectious disease, v. 33, n. 2, p. 75-80, 1999.

ERWIG, L. P.; GOW, N. A. R. **Interactions of fungal pathogens with phagocytes.** Nature Reviews Microbiology, v. 14, n. 3, p. 163-176, 2016.

FILHO, D. W.; SILVA, E. L.; BOVERIS, A. **Flavonoides antioxidantes de plantas medicinais e alimentos: importância e perspectivas terapêuticas.** J. B. Plantas Medicinais: sob a ótica da química medicinal moderna. Chapecó: Agros, 317-334, 2001.

FRANÇA, R. R. F. et al. **Inibidores Potentes da Enzima Esterol 14alfa-desmetilase Contra *Trypanosoma cruzi*.** Revista Virtual de Química, v. 6, n. 5, p. 1483-1516, 2014.

FRANZON, R. C. et al. **Araças do Gênero *Psidium*: principais espécies, ocorrência, descrição e usos.** Embrapa Cerrados, 2009;

GEORGIEV V., ANANGA A., TSOLOVA V. **Recent advances and uses of grape flavonoids as nutraceuticals.** Nutrients. 2014;6(1):391-415. doi: 10.3390/nu6010391.

GIARETTA, A.; PEIXOTO, A. L., **Myrtaceae da restinga no norte do Espírito Santo, Brasil.** Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão, v. 37, n. 1, 2015.

GONÇALVES, B., et al., **Vulvovaginal candidiasis: Epidemiology, microbiology and risk factors.** Crit. Rev. Microbiol. 42, 905–927, 2016;

GOW, N. A. R. ***Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization.** Nature Reviews Microbiology, v. 10, n. 2, p. 112-122, 2011.

GÓES, V. F. F. **Ação de extratos, óleos essenciais e frações isoladas de plantas medicinais sobre a formação do biofilme em *Candida* spp.** 2009. 141 f. Tese (doutorado em Biologia Buco-Dental), UNICAMP, Piracicaba, SP, 2009.

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

HARBORNE, J.B., **Phytochemical Methods. A guide to modern techniques of plant analysis.** Chappman & Hall. Londres, 1984.

HARBONE, J. B., WILLIAMS, C.A., **Advances in flavonoid research since 1992,** Phytochemistry, v. 55, p. 481- 504, 2000

HARVEY, A.L., EDRADA-EBEL, R., QUINN, R.J., **The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era.** Nat. Rev. Drug Discov. 14, 111–129, 2015.

HERZOG-SOARES, JD, et al., **Atividade tripanocida in vivo de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão verdadeiro) e *Caryocar brasiliensis* (pequi).** Rev Bras Farmacogn.;12:1–2, 2002.

HOLETZ, F.B., et al. **Biological effects of extracts obtained from *Stryphnodendron adstringens* on *Herpetomonas samuelpessoai*.** Mem Inst Oswaldo Cruz.;100:397–401, 2005;

HOSTE, H., et al., **Direct and indirect effects of bioactive tannin-rich tropical and temperate legumes against nematode infections.** Vet. Parasitol. 186, 18e27. 2012.

HUIE, C. W. **A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants.** Analytical and Bioanalytical Chemistry, v. 373, n. 1-2, p. 23-30, 2002.

JAVADPOUR, M.M., et al. **Again antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity,** Journal of Medicinal Chemistry, v.39, p.3107- 3113, 1996.

KATIYAR, S. K., E EDLIND, T. D. , **Identification and expression of multidrug resistance-related ABC transporter genes in *Candida krusei*.** Med. Mycol. 39, 109–116. doi: 10.1080/mmy.39.1.109.116, (2001).

KAWASAKI, M.L.; LANDRUM, L.R. 1997. **A rare and potentially economic fruit of Brazil ã cambuci, *Campomanesia phaea* (Myrtaceae).** Economic Botany 51:403-407.

KHANBABAEE, K.;VAN, R., Teunis. **Tannins: classification and definition.** Natural product reports, v. 18, n. 6, p. 641-649, 2001.

KHAN, R.U., et al., **Ethnobotanical study of food value flora of district Bannu Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan.** Journal of Medicinal Plants, v. 1, n. 4, 2013.

KLUMB, A.K, FARIA, O.L.V. **Produção de coagulante vegetal catiônico a partir de cascas de eucalipto (*Eucalyptus tereticornis*).** Vetor ,22(1): 71-80, 2012;

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

KOEHLER, P., TACKE, D. e CORNELLY, O. **Approach to candidaemia.** Mycoses, 57(9), 519–524. (2014). Our 2014 , doi:10.1111/myc.12203;

LACAZ, C. S.; DUPONT, B. **Tratado de Micologia Médica.** 9 ed. São Paulo: Sarvier, 2002

LAHLOU, M. **The success of natural products in drug discovery.** *Pharmacology & Pharmacy*, v. 4, n. 3, p.17-31, 2013.

LAZARY V.M.D. **Efeitos do consumo do isoflavona na prevenção do câncer de mama.** [Monografia]. Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde, Núcleo de Estudos em Educação e Promoção da Saúde, NESPROM, Brasília, 2010.

LAMPING, E., et al. **Abc1p is a multidrug efflux transporter that tips the balance in favor of innate azole resistance in *Candida krusei*.** *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 354–369, (2009). doi: 10.1128/AAC.01095-08

LEE, W.C., et al. **Free radicals scavenging activity, cytotoxicity and anti-parasitic activity of essential oil of *Psidium guajava* L. leaves against *Toxoplasma gondii*.** *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, v. 16, n. 1, p. 32-38, 2013.

LIMA, J.C.S., MARTINS, D.T.O., DE SOUZA, P.T., Experimental evaluation of stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville for anti-inflammatory activity. *Phyther Res.*12:218–20, 1998

LIMA, R. K.; et al., **Composition of the essential oil from the leaves of tree domestic varieties and one wild variety of the guava plant (*Psidium guajava* L., Myrtaceae).** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 20, n. 1, p. 41-44, 2010.

LÓPEZ-MARTÍNEZ, R., **Candidosis, a new challenge.** *Clinics in dermatology*, v. 28, n. 2, p. 178-184, 2010.

LI, D; BERNHARDT, J; CALDERONE, R. **Temporal expression of the *Candida albicans* genes CHK1 and CSSK1, adherence, and morphogenesis in a model of reconstituted human esophageal epithelial candidiasis.** *Infection and Immunity*, v. 70, n. 3, p. 1558-1565, 2002.

LOPES R.M., et al., **Flavonoides.** *Biocologia Ciência & Desenvolvimento.* 2010

LU, Y.; SU, C.; LIU, H., ***Candida albicans* hyphal initiation and elongation.** *Trends in microbiology*, v. 22, n. 12, p. 707-714, 2014

LUIZE, P.S. et al., **Effects of medicinal extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*.** *Brazilian J Pharm Sci.*, 41:1–10. , 2005;

MARZZOCO, A.; TORRES, B.B. **Bioquímica Básica.** 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 736p.

MCVAUGH, R., **Myrtaceae. In: Maguire, B. and coll., The Botany of the Guayana Highland.** Part VIII. *Memoirs of The New York Botanical Garden* 18(2): 55–286, 1969.

MENDES. J. M. **Investigação da atividade antifúngica do óleo essencial de *Eugenia caryophyllata* Thunb. sobre cepas de *Candida tropicalis*.** 2011. 74 f. Dissertação

(Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). Universidade Federal da Paraíba – UFPB, João Pessoa – PB, 2011.

MENEZES, T. O. A.; et al., **Avaliação in vitro da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos de plantas da região amazônica sobre cepa de *Candida albicans***. Revista de Odontologia da UNESP, vol. 38, n. 3, p. 184-191, 2009.

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

MONTEIRO, J. M. et al. **Taninos: uma abordagem da química à ecologia**. Química Nova, v. 28, n. 5, p. 892, 2005.

MORAIS-BRAGA, M.F.B. et al., **Composição química e avaliação da atividade antifúngica de extratos de *Psidium guajava* L. (Goiabeira) e *Psidium brownianum* MART. EX DC. (Araçá de veado) sobre espécies de *Candida***, Tese (Doutorado em Etnobiologia e Conservação da Natureza), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Biologia, Recife, 2016;

MUÑOZ, A. et al. **Biodegradation and mineralization of metolachlor and alachlor by *Candida xestobii***. Journal of agricultural and food chemistry, v. 59, n. 2, p. 619-627, 2010.

MOHR, J. et al., **Current options in antifungal pharmacotherapy**. Pharmacotherapy, v. 28, n. 5, p. 614–645, 2008.

MURRAY, P.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M.A. **Microbiología médica**. Elsevier Brasil, Cap. 69, p. 631-642, 2015.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. **Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010**. Journal of Natural Products, v. 75, n. 3, p. 311-35. 2012.

OLIVEIRA, K. A. D. M. et al. **Atividade antimicrobiana e quantificação de Flavonoides e Fenóis totais em diferentes extratos de Própolis**. Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, v. 33, n. 2, p. 211–222, 2013.

ORWA, C. et al., **Agroforestry Database: tree reference and selection guide version 4.0**. World Agroforestry Centre, Kenya, 2009. Disponível em: <<http://www.worldagroforestry.org/af/treedb/>>.

PAES, J.B. et al., **Avaliação do potencial tanífero de seis espécies florestais de ocorrência no semi-árido brasileiro**. Cerne 2006; 12(3): 232-238.

PAIVA, S. R. et al. **Taninos condensados de espécies de plumbaginaceae**. Floresta e Ambiente, Rio de Janeiro, v. 9, n. 1, p. 153-157, 2002.

PANIZZA, S., et al., *Stryphnodendron barbadetiman* (Vellozo) Martius: teor em tanino na casca e sua propriedade cicatrizante. Rev Bras Ciências Farm. 1988;10:101–6.

PARAMYTHIOTOU, E. et al., **Invasive fungal infections in the ICU: how to approach, how to treat.** Molecules, v. 19, n. 1, p. 1085-1119, 2014

PELEG, A. Y.; HOGAN, D. A.; MYLONAKIS, E. **Medically important bacterial–fungal interactions.** Nature Reviews Microbiology, v. 8, p. 340-349, 2010.

PEREIRA, R.; CARDOSO, M.. **Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes.** Journal of Biotechnology and Biodiversity, América do Norte, Vol. 3, N. 4: pp. 146-152, Novembro 2012.

PFALLER, M. A. **Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology, and Consequences for Treatment,** The American Journal of Medicine, v. 125, n 1, p. s3-s13, 2012;

PFALLER, M. A., et al., **Epidemiology and outcomes of candidemia in 3648 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH Alliance®) registry, 2004–2008.** Diagn Microbiol Infect Dis. 74:323–331., 2012.

PFALLER, MA, et al., **Candida bloodstream infections: comparison of species distribution and resistance to echinocandin and azole antifungal agents in intensive care unit (ICU) and non- ICU settings in the SENTRY antimicrobial surveillance program (2008–2009).** Int J Antimicrob Agents. 38:65-69, 2011.

PFALLER, M. A., et al., **Epidemiology and outcomes of invasive candidiasis due to non-*albicans* species of *Candida* in 2,496 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH) registry 2004-2008.** Plos One, 9:e101510. doi: 10.1371/journal.pone.0101510, (2014).

PFALLER, M. A., et al., ***Candida krusei*, a multidrug-resistant opportunistic fungal pathogen: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005.** J. Clin. Microbiol. 46, 515–521. doi: 10.1128/JCM.01915-07, (2008).

PELEGRINO, E.C.F., **Emprego de coagulante à base de tanino em sistema de pós-tratamento de efluente de reator UASB flotação** [dissertação]. São Carlos: Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de São Carlos; 2011. 155 p

SPAMPINATO, C.; LEONARDI, D., ***Candida* infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents.** Biomed Res Int 2013, 204237, 2013.

RAJASEKHARAN, S.K.; RAMESH, S.; BAKKIYARAJ, D., **Synergy of flavonoids with HDAC inhibitor: new approach to target *Candida tropicalis* biofilms.** J Chemother 27, 246-249, 2015.

ROMÁN, E.; et al., **MAP kinase pathways as regulators of fungal virulence.** Trends in Microbiology, v. 15, n. 4, p. 181-190, 2007.

SANDA, K.A., et al., **Pharmacological aspects of *Psidium guajava*: an update.** Inter. J. Pharmacol. 7, 316–324, 2011.

SARDI, J. C. O., et al., ***Candida* species: Current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options.** Journal of Medical Microbiology, 62(PART1), 10–24. doi:10.1099/jmm.0.045054-0, (2013).

SHAPIRO, R. S; ROBBINS, N; COWEN, L. E. **Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease.** Microbiology and Molecular Biology Reviews, Washington, v. 75, n. 2, p. 213-267, 2011.

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

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

SILVA, D. F. **Avaliação da atividade biológica de β - citronelol sobre *Candida albicans*.**, 2016. 62f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais Sintéticos e Bioativos – Farmacologia) – Universidade Federal da Paraíba, 2016.

SILVA, et al., **Study bioprospecting of medicinal plant extracts of the semiarid Northeast: Contribution to the controlo of oral microorganisms.** Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, v.2012, p.1-6, 2012. doi:10.1155/2012/681207.

SIMÕES, C.M.O. et al., **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 2ªed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora Artmed. 2017.

SOBEL, J.D., **Recurrent vulvovaginal candidiasis.** Am. J. Obstet. Gynecol. 214, 15–21, 2017.

SONMEZ, S., et al., **The effect of bee propolis on oral pathogens and human gingival fibroblast.** J Ethnopharmacol 102: 371-376, 2005

SOBRAL, M., et al., **Myrtaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB10853>>. BFG2015 Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. Rodriguésia, v.66, n.4, p.1085-1113. 2015. (DOI: 10.1590/2175-7860201566411)

STOPPA, M.A. et al. **Estudo comparativo entre as metodologias preconizadas pelo CLSI e pelo EUCAST para avaliação da atividade antifúngica.** Química Nova, v. 32, n. 2, p. 498-502, 2009.

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

THE PLANT LIST, 2016. (<http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-166741>) (accessed 10.02.18).

TAN, W. S. et al., **Moringa oleifera Flower Extract Suppresses the Activation of Inflammatory Mediators in Lipopolysaccharide-Stimulated, Macrophages via NF- κ B Pathway.** Mediators of Inflammation, v. 2015, p. 1-11, 2015.

TANAC, S.A. **Construindo o futuro todos os dias** [online], 2012. Disponível em: <http://www.tanac.com.br/PT/institucional.php?codCategoriaMenu=148&nomArea=Hist%C3%B3rico&codDado=2&menu=138>

TERRILL, T. H. et al. **Determination of extractable and bound condensed tannin concentrations in forage plants, protein concentrate meals and cereal grains.** Journal of the Science of Food and Agriculture, v. 58, n. 3, p. 321-329, 1992.

THOMAZ, A. M. A. U. et al. **ELABORAÇÃO E ACEITABILIDADE DE PRODUTOS DE PANIFICAÇÃO ENRIQUECIDOS COM SEMENTE DE GOIABA (*Psidium guajava* L.) EM PÓ.** Hólos, v. 5, n. 0, p. 199, 2014.

TRUGILHO, P.F, et al., **Avaliação do conteúdo em taninos condensados de algumas espécies típicas do cerrado mineiro.** Cerne, 3(1): 1-13, 1997;

VITAL, BR, et al., **Avaliação dos taninos da casca de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden como preservativo de madeira.** Revista Árvore, 25(2): 245-256. 2001;

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

WILLIAMS, D. W. et al. **Candida biofilms and oral candidosis: treatment and prevention.** Periodontology 2000, v. 55, n. 1, p. 250-265, 2013.

WINGARD, J.R., et al., **Increase in *Candida krusei* infection among patients with bone marrow transplantation and neutropenia treated prophylactically with fluconazole.** N Engl J Med. 1991;325:1274- 1277 [Google ScholarCrossref](#)

WISPLINGHOFF, H., BISCHOFF, T., TALLENT, S.M., **Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24.179 cases from a prospective nationwide**

surveillance study. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America.** 39: 309–317, 2004.

WONG, S. S. W. et al. ***In Vitro* and *In Vivo* Activity of a Novel Antifungal Small Molecule against *Candida* Infections.** Plos One, v. 9, n. 1, p. 1-17, 2014.

ANEXOS

ANEXO A: Comprovante de Submissão Artigo 1

Manuscripts 3

My Manuscripts

Submit a New Manuscript

Published Articles & Statistics

Special Issue 3

Submit to Special Issue

Current Special Issues

Propose a Special Issue

All Journals of Sciepub

About Sciepub

Contact Us

Submissions Under Review

Go Back

1. Anti-Candida activity of Psidium guajava L. (guava): chemical composition UPLC-MS-ESI-QTOF, growth inhibition, changes in cellular morphology and virulence factors.

Journal Title: *Journal of Food and Nutrition Research*
ID: 9000405518
Authors: (No Authors Entered)
Submission initiated on 28 May 2018

Note: If you have an emergency or you want to get your comments from our editors earlier, please click the 'Reminder Comments' to inform us your opinions. Please check whether the reminder has sent to the editorial director successful at the top right corner.

Editorial director has assigned 4 reviewers & editorial members to review this article.
Three reviewers & editorial members are reviewing this article(Agreed Assignment & Awaiting Comments).

Once we get the reviewers' comments, we will immediately send the comments to you. Please revise the manuscript according to reviewers' comments and guidelines. Once you have revised the manuscript, please e-mail it in MS Word format to journal@sciepub.com.

Download Manuscript File Reminder Comments

ANEXO B: Comprovante de Aceite Artigo 2

Your Submission Entrada x

Food and Chemical Toxicology <eesserver@eesmail.elsevier.com> 7 de mai ☆

para mim, jianboxiao, joseluis.domin. ▾

inglês > português Traduzir mensagem Desativar para: inglês x

Ms. Ref. No.: FCT-D-18-00606R1
Title: Analysis by UPLC-MS-QTOF and antifungal activity of guava (*Psidium guajava* L.)
Food and Chemical Toxicology

Dear Ms. Bezerra,

I am pleased to confirm that your paper "Analysis by UPLC-MS-QTOF and antifungal activity of guava (*Psidium guajava* L.)" has been accepted for publication in Food and Chemical Toxicology.

When your paper is published on ScienceDirect, you want to make sure it gets the attention it deserves. To help you get your message across, Elsevier has developed a new, free service called AudioSlides: brief, webcast-style presentations that are shown (publicly available) next to your published article. This format gives you the opportunity to explain your research in your own words and attract interest. You will receive an invitation email to create an AudioSlides presentation shortly. For more information and examples, please visit <http://www.elsevier.com/audioslides>.

NEW: Lab Resource. Did you develop one or several original cell lines during the course of your research (immortalized cells or genetically modified cell lines)? You can now submit the description of these unique cell lines to Toxicology Letters. The overarching criteria are that the unique cell lines are useful models for in vitro toxicant testing or to serve as a tool for insight into the mechanism of toxicant-induced cell injury. To submit a Lab Resource to Toxicology Letters: 1) Fill in this template http://ees.elsevier.com/toxlet/img/Lab_Resource_Template_TOXLET.docx. 2) Submit your article to <http://ees.elsevier.com/toxlet>, selecting the article type "Lab Resource".

Your accepted manuscript will now be transferred to our production department and work will begin on creation of the proof. If we need any additional information to create the proof, we will let you know. If not, you will be contacted again in the next few days with a request to approve the proof and to complete a number of online forms that are required for publication.

Thank you for submitting your work to this journal.

With kind regards,