

Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de *Eugenia anomala* e *Psidium salutare* (Myrtaceae) frente à *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*

SIMONETTI, E.¹; ETHUR, M.E.^{1*}; CASTRO, L.C.¹; KAUFFMANN, C.¹; GIACOMIN, A.C.¹; LEDUR, A.¹; AROSSI, K.¹; PACHECO, L.A.¹; GOETTERT, M.I.¹; FALEIRO, D.¹; FREITAS, E.M.¹

¹Centro Universitário UNIVATES, Rua Avelino Tallini 171 – Bairro Universitário - Lajeado/RS-Brasil, CEP 95900-000. *Autor para correspondência: eduardome@univates.br

RESUMO: As doenças transmitidas por alimentos ocorrem principalmente devido à ingestão de alimentos contaminados por microrganismos patogênicos, dentre eles a *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*. Uma das alternativas estudadas para minimizar a contaminação de alimentos é o emprego de plantas, ou seus extratos, como agentes antimicrobianos de origem natural em produtos alimentícios. Desta forma o objetivo do presente estudo é fornecer dados científicos a respeito de duas plantas nativas do RS ainda não estudadas, *Eugenia anomala* e *Psidium salutare*, visando potencial emprego como agente antimicrobiano natural em alimentos. Para tanto, avaliou-se a atividade antimicrobiana de extratos de *E. anomala* e *P. salutare* contra *E. coli* e *L. monocytogenes* através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de microdiluição em caldo, a capacidade antioxidante dos extratos por meio do método de redução do radical DPPH e a citotoxicidade *in vitro* empregando células CHO-K1. Os resultados obtidos mostraram que os extratos de acetato de etila e etanólico de ambas as espécies possuem ação antioxidante muito alta, de 94,08% e 93,86%, respectivamente. Apenas o extrato hexânico de *P. salutare* apresentou ação antimicrobiana moderada (CIM = 312,5 µg/mL). Todos os extratos apresentaram ação citotóxica sendo que os maiores percentuais foram do extrato clorofórmico de *E. anomala* (77,05%) e hexânico de *P. salutare* (76,79%), na concentração de 100 µg/mL. Assim, o presente estudo demonstrou que as espécies vegetais estudadas apresentam potencial para emprego como agente antimicrobiano destes microrganismos.

Palavras-chave: Concentração Inibitória Mínima, Citotoxicidade *in vitro*, Atividade Antioxidante.

ABSTRACT: Evaluation of the antimicrobial activity of extracts of *Eugenia anomala* and *Psidium salutare* (Myrtaceae) against the *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. The foodborne diseases occur mainly due to the ingestion of food contaminated by pathogenic microorganisms, including *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. One of the alternatives studied to minimize contamination of food is the use of plants or their extracts as antimicrobial agents naturally occurring in food products. The objective of this study is to provide scientific data on two native plants of RS have not studied *Eugenia anomala* and *Psidium salutare* for a potential use as a natural antimicrobial agent in food. To this end, we evaluated the antimicrobial activity of extracts of *E. anomala* and *P. salutare* against *E. coli* and *L. monocytogenes* by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) by the broth microdilution method, the antioxidant capacity of the extract for means DPPH radical reduction method and *in vitro* cytotoxicity using CHO-K1 cells. The results showed that the ethyl acetate and ethanolic extracts of both species have very high antioxidant activity, of 94.08% and 93.86%, respectively. Only the hexane extract of *P. salutare* showed a moderate antimicrobial activity (MIC = 312.5 mg/mL). Moreover, all extracts showed cytotoxic action of which the highest percentages were the chloroform extract of *E. anomala* (77.05%) and hexane *P. salutare* (76.79%) at a concentration of 100 mg/mL. Thus, the present study showed that plant species have potential for use as an antimicrobial agent against these microorganisms.

Keywords: Minimal inhibitory concentration (MIC), Cytotoxicity *in vitro*, Antioxidant Activity.

INTRODUÇÃO

As Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) vêm se ampliando o que demonstra a necessidade da criação de estratégias para sua minimização e prevenção (Germano & Germano, 2011; Tondo & Bartz, 2011). Ocorrem devido à ingestão de alimentos contaminados por microrganismos patogênicos, objetos lesivos, substâncias químicas ou substâncias tóxicas presentes naturalmente nos alimentos, sendo responsáveis por milhares de hospitalizações, centenas de mortes e muitas vezes complicações irreversíveis (Riedel, 2005; Germano & Germano, 2011).

Estudos epidemiológicos desenvolvidos na Europa e América do Norte identificaram os principais agentes etiológicos de toxinfecções alimentares, sendo eles: *Salmonella* spp, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* e *Escherichia coli* (Germano & Germano, 2011). Assim, a prevenção destas doenças torna-se fundamental uma vez que estas são uma das principais causas de mortalidade e perda da produtividade, a nível mundial (Germano & Germano, 2011; Tondo & Bartz, 2011). Dentre os diversos patógenos que podem estar envolvidos em toxinfecções e problemas relacionados ao uso de alimentos contaminados, estão a *Escherichia coli* (Gram-negativa) e *Listeria monocytogenes* (Gram-positiva), as quais serão o foco do presente estudo.

O desenvolvimento de pesquisas a cerca da aplicação de plantas com propriedades farmacológicas para o emprego no desenvolvimento de novos fármacos ou produtos para indústrias do segmento alimentício vêm ampliando-se e instigando os pesquisadores na descoberta de tais propriedades em plantas pouco ou nada estudadas. Neste contexto, a crescente busca por novos conhecimentos vêm mostrando que inúmeras plantas como as da família Myrtaceae apresentam expressiva atividade antimicrobiana frente a diferentes microrganismos (Vuotto et al., 2000; Lapcik et al., 2005; Nair & Chanda, 2007; Henie et al., 2009; Silva et al., 2010; Weston, 2010).

Além disso, a resistência microbiana aos antimicrobianos já existentes vem se tornando uma preocupação mundial e neste contexto uma das alternativas que está surgindo é o estudo de antimicrobianos de origem vegetal (Williams & Heyamn, 1998; Citoglu & Altanlar, 2003; Hamill et al., 2003; Silva et al., 2010).

As espécies vegetais *Eugenia anomala* e *Psidium salutare* pertencem à família Myrtaceae e são plantas nativas do Rio Grande do Sul/RS – Brasil.

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana de extratos

de *Eugenia anomala* e *Psidium salutare* contra *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de microdiluição, a capacidade antioxidante dos extratos por meio do método de redução do radical DPPH e a citotoxicidade *in vitro* empregando células CHO-K1. Podendo assim, fornecer dados científicos a respeito destas plantas nativas do RS e uma alternativa potencial de emprego de plantas como antimicrobiano natural a ser utilizado pelas indústrias de alimentos propiciando o uso seguro dos alimentos que venham a ser consumidos pela população.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

As amostras de *E. anomala* e *P. salutare* foram coletadas no município de Alegrete/RS, sendo que a parte da planta utilizada foi as folhas. Posteriormente, o material foi identificado pelos seguintes números de exsicata: *E. anomala* (HVAT 4083) e *P. salutare* (HVAT 4051) e estão armazenadas no MCN do Centro Universitário UNIVATES.

Preparação dos Extratos das Plantas

Para o preparo dos extratos primeiramente selecionou-se as folhas e submeteu-se a secagem em estufa a $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Em seguida o material vegetal foi triturado e submetido ao processo de extração por esgotamento empregando-se quatro solventes com polaridade distinta (hexano, clorofórmio, acetato de etila e etanol) na proporção de 1:10 (vegetal/solvente), respeitando-se esta sequência de polaridade. Cada solvente foi deixado em contato com o material vegetal durante 3 dias e em seguida filtrado e submetido à extração com outro solvente, de acordo com a polaridade.

Os extratos obtidos foram rotaevaporados em rotaevaporador termostatizado e refrigerados a $2 - 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento das análises. Desta forma, obteve-se quatro extratos de *E. anomala* e de *P. salutare* (hexânico, clorofórmico, acetato de etila e etanólico).

Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada através da avaliação da redução do radical DPPH por espectrofotometria conforme a metodologia adaptada desenvolvida por Brand-Williams et al. (1995) empregando como padrão antioxidante o ácido ascórbico. Foram preparadas soluções do padrão de ácido ascórbico e dos extratos de *E. anomala* e *P. salutare* nas concentrações de 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,125 $\mu\text{g/mL}$. Em cubetas foi adicionado

1 mL de cada uma das soluções preparadas, 1 mL de metanol e 2 mL de solução de DPPH 0,004%. Transcorridos 30 minutos foi lida a absorbância a 517 nm em espectrofotômetro UV-VIS. Foram realizadas três repetições deste teste.

Lidas as absorbâncias calculou-se a atividade antioxidante (AA%) das amostras e do padrão conforme a fórmula abaixo:

$$\%AA = 100 - [(Abs \text{ amostra} - Abs \text{ branco}) / Abs \text{ controle}] \times 100$$

Onde: Abs amostra - a absorbância da amostra. Abs branco - absorbância do branco (solução sem DPPH). Abs controle - absorbância do controle (contém somente metanol e solução de DPPH).

A atividade antioxidante dos extratos de *E. anomala* e *P. salutare* foi expressa em concentração necessária para inibir 50% (IC₅₀) do radical livre DPPH tendo como controle positivo o ácido ascórbico.

Atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos contra *E. coli* e *L. monocytogenes* foi realizada pelo método microdiluição conforme metodologia adaptada das normas do "Clinical and Laboratory Standards Institute" (CLSI) (NCCLS document M7-A7, 2006). Foram empregadas linhagens padrão American Type Culture Collection de *E. coli* (ATCC 25922) e de *L. monocytogenes* (ATCC 7644) cedidas pelo Laboratório de Microrganismos de Referência da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ.

Foram preparadas soluções estoque dos extratos na concentração de 20.000 µg/mL diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) 0,5% e água purificada estéril. Como padrão antimicrobiano foi empregado o cloranfenicol 0,2 µg/µL e como controle do diluente foi utilizado uma solução de DMSO 0,5%. Os inóculos de *E. coli* e *L. monocytogenes* foram preparados em meio específico e padronizados numa concentração de 1,5 x 10⁸ UFC/mL.

Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos a solução estoque de cada extrato, do controle antimicrobiano e do diluente foi adicionada em placas de plástico estéreis de 96 poços e acrescidos com o inóculo padronizado. Em seguida foram procedidas sucessivas diluições, sendo que foi realizado um controle positivo (somente o inóculo) e um controle negativo (somente o meio de cultura).

Desta forma, obteve-se as seguintes concentrações para cada extrato: 10.000 µg/mL, 5.000 µg/mL, 2.500 µg/mL, 1.250 µg/mL, 625 µg/mL, 312,5 µg/mL, 156,2 µg/mL, 78 µg/mL, 39 µg/mL,

19,5 µg/mL, 9,8 µg/mL e 4,9 µg/mL. Para o padrão antimicrobiano obteve-se as concentrações de 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 6,25 µg/mL e 3,125 µg/mL.

Realizadas as diluições as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C ± 1 °C durante 18 horas para *E. coli* e 24 horas para a *L. monocytogenes*. Transcorrido o tempo de incubação determinou-se a CIM através da aplicação de 16 µL de solução aquosa estéril de cloreto de trifeniltetrazólio 0,5% (TTC) em todos os poços. Nos poços em que não houve a formação de coloração vermelha procedeu-se o plaqueamento em placas de Petry contendo meio Ágar Mueller-Hinton e meio Oxford suplementado para *E. coli* e *L. monocytogenes*, respectivamente e incubou-se em estufa bacteriológica a 37 °C ± 1 °C durante 18 horas e 24 horas para *E. coli* e *L. monocytogenes*, respectivamente.

Transcorrido o tempo de incubação procedeu-se a avaliação da concentração bactericida mínima determinada pelo não crescimento bacteriano nas placas. Foram realizadas três repetições deste teste.

Avaliação da Citotoxicidade *in vitro* dos Extratos

A avaliação da citotoxicidade *in vitro* dos extratos foi realizada pelo método de Alamar Blue utilizando células epiteliais de ovário de Hamster Chinês (CHO-K1).

Foi preparada uma solução contendo meio Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM + HAM F10), suplementado com 10% de SBF e as células onde em placas de 96 poços foram adicionados 200 µL de solução contendo células a uma densidade de 2 x 10⁴ células/poço. Incubou-se durante 4 horas em incubadora com atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C e transcorrido o tempo, desprezou-se o meio contido nas placas e as células foram lavadas com 200 µL de solução de lavagem de tampão fosfato salina (PBS) e em seguida, procedeu-se o tratamento das células adicionando-se primeiramente 200 µL de solução dos extratos na concentração de 100 µg/mL, do padrão doxorubicina (100 µM, 10 µM, 1 µM, 0,1 µM e 0,01 µM), do controle negativo de DMSO (1%) e do controle do meio (meio DMEM + HAM F10 + células).

As placas foram novamente incubadas por 48 horas sob as mesmas condições. Transcorrido o tempo, o tratamento foi removido e adicionou-se uma solução de 10% de corante Alamar Blue em cada poço. Após, incubou-se durante 5 horas e procedeu-se a leitura das absorbâncias, em 540 nm (estado oxidado) e 630 nm (estado reduzido) em leitor de ELISA. Procedeu-se o cálculo da morte celular em percentagem (%).

Para os extratos que provocaram maior grau de morte celular (próximo a 75%) procedeu-se a avaliação da citotoxicidade empregando-se três diferentes concentrações 100, 50 e 25 µg/mL e calculou-se o IC₅₀, sendo utilizado como padrão de comparação a doxorubicina.

Análise Estatística

Para a análise estatística da atividade antioxidante e na citotoxicidade *in vitro* empregou-se a média de três repetições ± desvio padrão. Aplicou-se ANOVA um critério. Utilizou-se o programa BioEstat 5.0 e Excel 2010.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atividade Antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante dos extratos de *E. anomala* e *P. salutare* foi procedida conforme metodologia adaptada da desenvolvida por Brand-Williams et al. (1995), a qual baseia-se na redução do radical livre difenil-picril-hidrazina (DPPH) na presença de substâncias antioxidantes que pode ser observada pelo decréscimo da absorbância e visualizada pela alteração da coloração da solução de púrpura para amarelo.

O percentual de atividade antioxidante (AA%) dos extratos de *E. anomala* e *P. salutare* e do padrão de ácido ascórbico com o respectivo desvio-padrão está apresentado na Tabela 1 e 2, respectivamente:

Pode-se observar que a AA% dos extratos etanólico e de acetato de etila em ambas as espécies vegetais foi maior, onde houve aumento nesta atividade de acordo com o aumento da concentração do extrato analisado, sendo que na maior concentração analisada de 50 µg/mL o extrato

etanólico seguido pelo de acetato de etila de *E. anomala* apresentaram maior atividade antioxidante de 86,78% e 62,86%, respectivamente.

Para *P. salutare* o extrato de acetato de etila seguido pelo etanólico, apresentaram maior atividade antioxidante de 94,08% e 93,86%, respectivamente. Estes extratos apresentaram percentual de atividade antioxidante (AA%) próxima ao padrão de ácido ascórbico onde na maior concentração analisada (50 µg/mL) a AA% foi de 95,05%. Os extratos hexânico e clorofórmico de ambas as espécies vegetais, apresentaram AA% muito inferior (abaixo de 50%) se comparados aos extratos etanólico e de acetato de etila e também com o padrão de ácido ascórbico, sendo assim não apresentaram valor de IC₅₀.

Obtidos os valores de atividade antioxidante (%) calculou-se o IC₅₀ dos extratos que tiveram percentual superior a 50%, sendo eles: o extrato etanólico e de acetato de etila. A Tabela 3 apresenta os valores de IC₅₀ dos extratos de ambas as espécies vegetais e do padrão de ácido ascórbico, com seus respectivos valores de desvio padrão.

Analisando os valores de IC₅₀ dos extratos pode-se perceber que o extrato etanólico de *E. anomala* e *P. salutare* apresentaram menor valor de IC₅₀, 19,26 ± 0,19 e 13,63 ± 0,51, respectivamente. O extrato etanólico de *P. salutare* foi o extrato que apresentou o IC₅₀ mais próximo ao do padrão de ácido ascórbico que teve IC₅₀ de 9,27 ± 0,07. Entretanto ao aplicar-se análise estatística utilizando-se teste de Tukey houve diferença significativa ($p < 0,01$) entre o padrão e o extrato.

Diversos estudos encontrados na literatura demonstram haver atividade antioxidante em extratos de plantas da família Myrtaceae e dos gêneros *Eugenia* e *Psidium*. Extratos obtidos

TABELA 1. Atividade Antioxidante (AA%) dos extratos de *E. anomala* em comparação ao padrão Ácido Ascórbico.

Concentração (µg/mL)	Etanólico	Acetato de Etila	Hexânico	Clorofórmico	Padrão
50	86,78 ± 0,73	62,86 ± 0,17	16,37 ± 0,59	11,24 ± 0,43	95,05 ± 0,25
25	58,98 ± 0,26	39,35 ± 0,58	10,58 ± 0,10	6,67 ± 0,36	88,41 ± 0,61
12,5	35,12 ± 0,50	23,12 ± 0,45	4,69 ± 0,56	5,54 ± 0,49	72,36 ± 0,50
6,25	22,27 ± 0,23	17,63 ± 0,71	4,67 ± 0,59	5,33 ± 1,77	20,43 ± 0,55
3,125	11,56 ± 0,53	8,82 ± 1,21	0,89 ± 0,22	2,86 ± 0,07	2,58 ± 0,61

TABELA 2. Atividade Antioxidante (AA%) dos extratos de *P. salutare* em comparação ao padrão Ácido Ascórbico.

Concentração (µg/mL)	Etanólico	Acetato de Etila	Hexânico	Clorofórmico	Padrão
50	93,86 ± 0,11	94,08 ± 0,13	5,36 ± 0,13	46,68 ± 0,17	95,05 ± 0,25
25	81,97 ± 2,21	61,43 ± 1,08	2,13 ± 0,40	23,99 ± 0,05	88,41 ± 0,61
12,5	45,51 ± 1,97	32,85 ± 0,22	1,24 ± 0,05	11,66 ± 0,52	72,36 ± 0,50
6,25	24,33 ± 0,89	17,38 ± 0,29	1,03 ± 0,21	5,58 ± 0,73	20,43 ± 0,55
3,125	11,53 ± 0,79	8,9 ± 0,38	0,61 ± 0,43	1,37 ± 0,34	2,58 ± 0,61

TABELA 3. Atividade Antioxidante (IC₅₀) dos extratos de *E. anomala* e *P. salutare* e respectivo desvio padrão.

Extratos	IC ₅₀ - µg/mL		
	<i>E. anomala</i>	<i>P. salutare</i>	Padrão
Hexânico	NA*	NA	9,27 ± 0,07
Clorofórmio	NA	NA	9,27 ± 0,07
Acetato de etila	34,22 ± 0,38	18,96 ± 0,27	9,27 ± 0,07
Etanólico	19,26 ± 0,19	13,63 ± 0,51	9,27 ± 0,07

* NA = Extratos que não apresentaram percentual de inibição superior a 50% (Tabelas 1 e 2).

de plantas da espécie *Eugenia* nos estudos realizados por Reynertson et al. (2005), Carvalho Jr. et al. (2014) e John et al. (2014) também demonstraram potencial antioxidante promissor nas espécies *E. aggregata*, *E. foetida*, *E. stipitata*, *E. uniflora*, *M. cauliflora* e *S. samarangense*; *Eugenia copacabanensis* Kiaersk; *Eugenia singampattiana*, respectivamente, que podem estar relacionados à presença de flavonoides.

Os extratos obtidos de plantas da espécie *P. guajava* L. em diferentes estudos demonstraram possuir atividade antioxidante promissora, ação antimicrobiana e ser constituída por flavonoides, saponinas, taninos, compostos fenólicos. Sendo que a ação antioxidante dos extratos está relacionada ao conteúdo de compostos fenólicos presentes (Braga et al., 2014; Castro et al., 2014; Fernandes et al., 2014; Moreno et al., 2014; Seo et al., 2014; Thakur & Arya, 2014).

O conteúdo de compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante estão relacionados com a capacidade de extração de componentes de acordo com o grau de polaridade do solvente e da relação entre soluto e o solvente, sendo que a ação antioxidante é maior em extratos obtidos com solventes mais polares (Turkmen et al., 2006; Carvalho Jr. et al., 2014; Settharaksa et al., 2014).

Desta forma, no presente estudo os resultados obtidos de IC₅₀ com o extrato etanólico de *E. anomala* e *P. salutare* de 19,26 e 13,63 µg/mL, respectivamente, estão relacionados com a polaridade do solvente empregado o qual extrai compostos com ação antioxidante, como por exemplo, os flavonoides e compostos fenólicos.

A classificação da atividade antioxidante de extratos está relacionada a resultados inferiores de

IC₅₀ os quais indicam maior atividade antioxidante do extrato avaliado, sendo que um IC₅₀ inferior a 50 µg/mL é considerado muito ativo, de 50 – 100 µg/mL moderadamente ativo, 100 – 200 µg/mL é pouco ativo e valor superior a 200 µg/mL é considerado inativo (Reynertson et al., 2005). Assim, os extratos de acetato de etila e etanólico *E. anomala* e *P. salutare* apresentam ação antioxidante muito alta, sendo que os extratos clorofórmico e hexânico não apresentam atividade antioxidante (inativos).

Atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos de *E. anomala* e *P. salutare* contra *E. coli* e *L. monocytogenes* foi realizada pelo método de microdiluição que baseia-se na sucessiva diluição das amostras em placas de 96 poços e submete-se o microrganismo a ação do extrato em estudo.

A determinação da concentração inibitória mínima dos extratos foi confirmada após a adição da solução de TTC 0,5% e a observação da formação de coloração vermelha (rosada) nos poços, que indica crescimento microbiano devido à inatividade do extrato empregado sendo este incapaz de inibir o crescimento do microrganismo em estudo, não possuindo ação bacteriostática. Os poços que não apresentaram alteração na sua coloração e que permaneceram transparentes ou com cor característica, possuem ação bacteriostática, pois inibiram o crescimento microbiano (Gabrielson et al., 2002). Os valores de CIM e CBM dos extratos contra *E. coli* e *L. monocytogenes* estão apresentados nas Tabelas 4 e 5, respectivamente.

Comparando-se os resultados obtidos dos extratos das duas espécies vegetais, observa-se que os extratos da espécie de *E. anomala* apresentaram melhor potencial de ação antimicrobiana frente a

TABELA 4. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos de *E. anomala* e *P. salutare* frente à *E. coli*.

Extratos (µg/mL)	<i>E. anomala</i>		<i>P. salutare</i>		Padrão	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
Hexânico	5.000	> 10.000	10.000	> 10.000	< 6,25	< 6,25
Clorofórmico	> 10.000	> 10.000	10.000	> 10.000	< 6,25	< 6,25
Acetato de Etila	5.000	> 10.000	10.000	> 10.000	< 6,25	< 6,25
Etanólico	2.500	10.000	5.000	> 10.000	< 6,25	< 6,25

E. coli onde o extrato etanólico apresentou CIM de 2.500 µg/mL e CBM de 10.000 µg/mL, sendo o único extrato de ambas as espécies vegetais que apresentou ação bacteriostática e bactericida. O extrato hexânico e de acetato de etila de *E. anomala* apresentaram a CIM de 5.000 µg/mL, sendo que o extrato clorofórmico não demonstrou possuir ação bacteriostática nem bactericida nas concentrações avaliadas.

Quanto à espécie *P. salutare*, o extrato etanólico apresentou melhor potencial antimicrobiano se comparados aos demais extratos desta espécie vegetal, sendo sua CIM de 5.000 µg/mL (bacteriostático). Já os extratos hexânico, clorofórmico e de acetato de etila de *P. salutare*, apresentaram CIM de 10.000 µg/mL (bacteriostático), sendo que nenhum dos extratos apresentou ação bactericida contra a *E. coli*.

Pode-se observar que os extratos de ambas as espécies vegetais apresentaram ação bacteriostática contra *L. monocytogenes*. Os extratos de *E. anomala* apresentaram ação bacteriostática menos expressiva se comparada aos extratos de *P. salutare*, sendo que o extrato que apresentou CIM mais baixa é o extrato clorofórmico onde a CIM = 1.250 µg/mL e CBM = 10.000 µg/mL, seguido pelo extrato etanólico o qual apresentou CIM = 2.500 µg/mL e CBM = 10.000 µg/mL. Quanto à espécie *P. salutare*, o extrato que apresentou atividade antimicrobiana mais pronunciada dentre os extratos foi o hexânico o qual teve CIM = 312,5 µg/mL e CBM = 625 µg/mL apresentando assim ação bacteriostática e bactericida nessas concentrações, respectivamente. Os demais extratos clorofórmico, de acetato de etila e etanólico apresentaram CIM = 1.250 µg/mL (bacteriostático) e CBM = 10.000 µg/mL (bactericida).

Quando comparadas as CIMs dos extratos de ambas as espécies vegetais frente a *E. coli* e *L. monocytogenes* pode-se observar que os extratos da espécie *E. anomala* apresentaram ação bacteriostática em concentrações próximas tanto contra *E. coli* quanto *L. monocytogenes*, enquanto que os extratos da espécie *P. salutare* demonstraram tal ação mais pronunciada contra a *L. monocytogenes*, podendo-se sugerir que extratos da espécie *P. salutare* apresentam ação antimicrobiana

contra patógenos Gram-positivos.

Obtidos os valores de CIM e CBM, os extratos vegetais de *E. anomala* e *P. salutare* foram avaliados quanto a sua ação antimicrobiana de acordo com os valores de CIM contra os patógenos estudados onde extratos que apresentam CIM < 100 µg/mL têm potencial antimicrobiano promissor (bom), CIM entre 100 – 500 µg/mL possui atividade inibitória moderada, CIM entre 500 – 1.000 µg/mL apresenta atividade inibitória fraca e extratos que apresentaram CIM superior a 1.000 µg/mL são inativos frente aos patógenos (Fabry et al., 1998; Holetz et al., 2002; Dall'Agnol et al., 2003; Tanaka et al., 2005; Chavasco et al., 2014).

Desta forma, os resultados obtidos a partir da avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos das espécies vegetais estudadas através do método de microdiluição mostram que somente o extrato hexânico de *P. salutare* possui atividade antimicrobiana sendo ela considerada moderada contra *L. monocytogenes*, pois, apresentou uma CIM de 312,5 µg/mL. Os demais extratos são inativos contra ambas as bactérias estudadas uma vez que tiveram CIM superior a 1.000 µg/mL, mesmo que tenham apresentado ação bacteriostática e/ou bactericida em concentrações maiores.

O gênero *Eugenia* representa um grupo de plantas que apresenta em sua composição compostos bioativos com atividade antimicrobiana e analisando-se diferentes estudos realiza-se que tanto extratos vegetais quanto óleos essenciais deste gênero apresentam ação antimicrobiana com diferentes graus de atividade (moderada, forte ou inativa) contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas dependendo da espécie vegetal avaliada, sendo que alguns possuem tal atividade exclusivamente contra Gram-negativas ou Gram-positivas. Alguns exemplos destes estudos avaliaram: o extrato de *Eugenia uniflora* que apresentou atividade moderada contra *E. coli* e *S. aureus* e o extrato de *P. guajava* que teve atividade moderada contra *E. coli*, *B. subtilis* e *S. aureus* (Holetz et al., 2002); o extrato bruto de *Eugenia uniflora* que não apresentou ação antimicrobiana frente a *E. coli* (Souza et al., 2004); o óleo essencial de *Eugenia brasiliensis* e *Eugenia umbelliflora* que inibiram fortemente o crescimento de *S. aureus*

TABELA 5. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima dos extratos de *E. anomala* e *P. salutare* frente à *L. monocytogenes*.

Extratos (µg/mL)	<i>E. anomala</i>		<i>P. salutare</i>		Padrão	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
Hexânico	10.000	> 10.000	312,5	625	< 12,5	< 12,5
Clorofórmico	1.250	10.000	1.250	10.000	< 12,5	< 12,5
Acetato de Etila	5.000	> 10.000	1.250	10.000	< 12,5	< 12,5
Etanólico	2.500	10.000	1.250	10.000	< 12,5	< 12,5

(Magina et al., 2009); o extrato bruto etanólico de *Eugenia caryophyllata* que apresentou excelente atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes* (Bayoub et al., 2010); o extrato etanólico de *Eugenia obtusifolia* que apresentou ação antimicrobiana interessante contra *E. coli* (Bussmann et al., 2010); o óleo essencial de *Eugenia uniflora* que demonstrou ação antimicrobiana contra *S. aureus*, *B. subtilis*, *S. faecalis*, *S. albus* e é menos ativo contra Gram-negativos (Mohanakrishnan et al., 2013); o extrato bruto de *Eugenia pyriformis* Cambess que não apresentou atividade antimicrobiana contra diversos microrganismos (Chavasco et al., 2014); os extratos de folhas de *Eugenia singampattiana* obtidos com diferentes solventes como éter de petróleo, benzeno, acetato de etila, metanol e etanol que com exceção do extrato de benzeno, os demais apresentaram ação antimicrobiana contra diferentes microrganismos Gram-negativos e Gram-positivos (Tresina & Mohan, 2014).

Estes dados condizem com o encontrado no nosso estudo, uma vez que os extratos da espécie *E. anomala* foram inativos contra *E. coli* e *L. monocytogenes*, apresentando eles ação bacteriostática e bactericida em concentrações elevadas (CIM acima 1.000 µg/mL).

Além disso, diversos estudos avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos de plantas do gênero *Psidium*, especificamente de *P. guajava* L., contra diferentes patógenos os quais também demonstraram que este gênero apresenta ação antimicrobiana variável contra microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos sendo que dentre os estudos analisados, tal atividade é mais pronunciada contra os microrganismos Gram-positivos variando entre as espécies e bactérias, podendo também não haver tal atividade (extratos inativos). Alguns destes estudos investigaram a ação: de extratos etanólico:água (1:1, 7:3 e 9:1) de folhas, raízes e caule de *P. guajava* L. que demonstrou ser eficaz contra bactérias Gram-positivas e praticamente inativos contra Gram-negativos (Sanchez et al., 2005); de frações de metanol, acetona e N,N-dimetilformamida das folhas de *P. guajava* que mostrou que os extratos apresentam ação antimicrobiana mais pronunciada contra bactérias Gram-positivas e moderada frente Gram-negativa (Nair & Chanda, 2007); de extrato etanólico de *P. guajava* que apresentou excelente atividade antimicrobiana contra todos os microrganismos avaliados (Hema et al., 2009); do extrato etanólico da casca da raiz de *P. guajava* que apresentou atividade antimicrobiana em todas as concentrações testadas (Kuber et al., 2013); de extratos brutos de folhas e casca de *P. guajava* contra *S. aureus* e *S. epidermidis* e demonstraram ação antimicrobiana frente aos microrganismos testados (Richard et al.,

2013); de extratos brutos de *P. guajava* e outras duas espécies da família Myrtaceae (*Myrciaria cauliflora* e *Syzygium cumini*) contra as bactérias *B. subtilis* subsp. *spizizenii*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. enterica* subsp., *P. aeruginosa* e *S. aureus* e os resultados demonstraram que as bactérias Gram-negativas foram mais suscetíveis aos extratos testados (Bona et al., 2014); de extratos aquoso, metanólico, etanólico e de éter de petróleo de galhos jovens de *P. guajava* L. onde o extrato etanólico possui ação antimicrobiana contra *B. cereus* e *S. epiderme* e o metanólico ação contra *B. cereus*, *S. epidermis*, *E. coli*, *S. aureus* e *P. vulgaris* (Chetia et al., 2014); de extratos brutos de metanol, hexano e acetato de etila de *P. guajava* contra *S. aureus*, *S. pyogenes*, *B. subtilis*, *C. albicans* e *P. aeruginosa* onde os extratos possuem atividade antimicrobiana contra todos os microrganismos testados, sendo o extrato metanólico o mais eficiente (Egga et al., 2014).

Desta forma, os resultados obtidos neste estudo avaliando-se extratos de *P. salutare* contra *E. coli* e *L. monocytogenes* estão em consonância com o apresentado em outros estudos, sendo que somente o extrato hexânico apresentou ação antimicrobiana moderada contra *L. monocytogenes* e os demais extratos foram inativos contra *E. coli* e *L. monocytogenes*.

Ainda, percebe-se que em diversos dos estudos citados anteriormente os extratos brutos apresentam atividade antimicrobiana mais promissora quando comparada aos extratos fracionados ou que empregaram solventes com polaridades distintas, sendo que tal atividade pode estar relacionada ao sinergismo entre os constituintes fitoquímicos das plantas. Portanto, extratos brutos de espécies vegetais podem muitas vezes apresentar ação antimicrobiana mais pronunciada (efetiva) contra patógenos devido ao sinergismo entre os constituintes bioativos que são extraídos pelo solvente ou método de extração empregado, uma vez que substâncias isoladas podem alterar suas propriedades na presença de outras substâncias (Lee & Lee, 2010; Delgado-Adámez et al., 2012).

Desta forma, a presença de fitocomplexos em extratos brutos de plantas pode estar relacionada a ação antimicrobiana uma vez que o sinergismo entre os constituintes pode demonstrar efetividade maior contra os microrganismos testados se comparados a outros tipos de extratos (Arias et al., 2004; Simões et al., 2004).

Além disso, a ação antimicrobiana do extrato de *P. salutare* contra a *L. monocytogenes* pode estar relacionada ao fato das bactérias Gram-positivas serem mais sensíveis por apresentarem uma camada única na parede celular, já as bactérias Gram-negativas apresentam uma camada extra de

lipopolissacarídeos e proteínas na parede celular que formam uma barreira de permeabilidade a agentes antimicrobianos (Forsythe, 2013).

Visto que não há na literatura mais estudos que demonstram as atividades biológicas das espécies vegetais estudadas *E. anomala* e *P. salutare*, pode-se sugerir a otimização na produção de extratos vegetais destas espécies empregando-se outros métodos de extração e/ou mistura de solventes que podem extrair substâncias bioativas com ação antimicrobiana isolada ou sinérgica.

Citotoxicidade *in vitro* dos Extratos

Para a avaliação da citotoxicidade *in vitro* primeiramente determinou-se a morte celular (%) causada pelos extratos de *E. anomala* e *P. salutare* na concentração de 100 µg/mL para selecionar aqueles que apresentaram inibição celular próxima a 75%. Na Tabela 6 está apresentado o percentual de morte celular (%) e seu respectivo desvio padrão.

Pode-se observar que os extratos de ambas as espécies apresentaram mortalidade celular próximas ficando entre 58,95 a 77,05% sendo que entre a espécie *E. anomala* os extratos hexânico e clorofórmico apresentaram grau de mortalidade celular (%) mais elevado ($74,04 \pm 4,17$ e $77,05 \pm 1,29$, respectivamente), enquanto na espécie *P. salutare* foi o extrato hexânico que teve percentual maior ($76,79 \pm 0,50$). Todos os extratos demonstraram perfil citotóxico parecido causando morte celular acima de 60%. Desta forma os extratos de ambas as espécies vegetais podem ser considerados tóxicos numa concentração de 100 µg/mL.

Os extratos foram classificados quanto à potência citotóxica de acordo com o percentual de morte celular causado nas células testadas, onde é considerada elevada a atividade citotóxica (mais de 75% de morte celular), atividade moderada (entre 51 – 75%) e nenhuma atividade (abaixo de 50%). Desta forma, o extrato clorofórmico de *E. anomala* e o hexânico de *P. salutare* apresentaram elevada atividade citotóxica (77,05 e 76,79%, respectivamente) e os demais extratos avaliados possuem atividade citotóxica moderada, pois, a morte celular variou entre 58,95 a 74,04% (Mahmoud et al., 2011).

Aplicando-se análise estatística nos dados obtidos de citotoxicidade (% morte celular) não

houve diferença significativa entre os extratos de ambas as espécies vegetais estudadas.

A partir dos resultados obtidos da morte celular causada pelos extratos selecionou-se aqueles que provocaram maior grau de morte celular (próximo a 75%) e procedeu-se a avaliação da citotoxicidade empregando-se três diferentes concentrações sendo elas de 100, 50 e 25 µg/mL e calculou-se o IC₅₀. O padrão de comparação utilizado foi a doxorubicina.

A citotoxicidade do padrão apresentou um valor de IC₅₀ de 1,88 µg/mL, enquanto que os extratos atingiram valores de IC₅₀ mais elevados sendo o extrato clorofórmico e hexânico de *E. anomala* (IC₅₀ de 25,56 µg/mL e 31,25 µg/mL, respectivamente) e extrato hexânico de *P. salutare* (IC₅₀ de 55,34 µg/mL).

Conforme os critérios estabelecidos pelo Instituto Nacional Americano de Câncer (INC), a citotoxicidade de extratos brutos em ensaios preliminares deve apresentar o limite máximo de IC₅₀ de 30 µg/mL para ser considerado promissor para purificação e emprego como antineoplásico (Suffness & Pezzuto, 1990; Itharata et al., 2004; Alzeer et al., 2014). Desta forma, os extratos clorofórmico e hexânico de *E. anomala* apresentaram citotoxicidade muito interessante e promissora, pois o IC₅₀ encontrado para ambos (25,56 e 31,25 µg/mL, respectivamente) esteve próximo ao estabelecido para o emprego como antineoplásico.

Além disso, a avaliação da atividade antimicrobiana mostrou que o extrato hexânico de *P. salutare* foi o único extrato dentre as espécies estudadas que possui atividade moderada contra *L. monocytogenes* (CIM = 312,5 µg/mL) e ação citotóxica elevada (morte celular = 76,79%) a uma concentração de 100 µg/mL sugerindo assim uma correlação positiva entre tais atividades. Pode-se sugerir a realização de mais estudos para a avaliação da citotoxicidade e da atividade antitumoral dos extratos de *E. anomala* e *P. salutare* empregando-se diferentes linhagens celulares normais e neoplásicas na busca por um agente antineoplásico promissor advindo de planta, uma vez que extratos obtidos de plantas são uma fonte muito interessante para o desenvolvimento de novos fármacos desta categoria (Alzeer et al., 2014).

TABELA 6. Morte celular (%) provocado pelos extratos de *E. anomala* e *P. salutare*.

Extratos	Citotoxicidade (% Morte Celular)	
	<i>E. anomala</i>	<i>P. salutare</i>
Hexânico	74,04 ± 4,17	76,79 ± 0,50
Clorofórmico	77,05 ± 1,29	58,95 ± 3,63
Acetato de Etila	61,78 ± 3,57	61,03 ± 5,30
Etanólico	61,90 ± 3,84	63,10 ± 2,21

CONCLUSÃO

O presente estudo colaborou para a ampliação dos conhecimentos a respeito da atividade antioxidante, antimicrobiana e citotoxicidade *in vitro* dos extratos hexânico, clorofórmico, de acetato de etila e etanólico de *E. anomala* e *P. salutare* que tratam-se de espécies vegetais ainda não referenciadas em publicações científicas mas que demonstraram ter potencial promissor para novos estudos e possível aplicação como antioxidante ou antimicrobiano de origem natural em produtos alimentícios ou como agente antineoplásicos. Novos estudos necessitam ser realizados otimizando-se o método de extração dos constituintes fitoquímicos das plantas para avaliação do possível aumento nas atividades biológicas e aprimoramento dos resultados.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a FAPERGS e CNPq (edital PRONEX-10/00290) por parte do apoio financeiro, e ao Laboratório de Microrganismos de Referência, do Instituto Oswaldo Cruz, pelos microrganismos cedidos.

REFERÊNCIAS

- ALZEER, J. et al. The influence of extraction solvents on the anticancer activities of Palestinian medicinal plants. **Journal of Medicinal Plant Research**, v.8, n.8, p.408-415, 2014.
- ARIAS, M.E. et al. Antibacterial activity of ethanolic and aqueous extracts of *Acacia aroma* Gill. ex Hook et Arn. **Life Sciences**, v.75, p.191–202, 2004.
- BAYOUB, K. et al. Antibacterial activities of the crude ethanolic extracts of medicinal plants against *Listeria monocytogenes* and some other pathogenic strains. **African Journal of Biotechnology**, v.9, n.27, p.4251-4258, 2010.
- BONA, E. A. M. et al. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.81, n.3, p.218-225, 2014.
- BRAND-WILLIAMS, W. et al., Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v.28, n.1, p.25-30, 1995.
- BUSSMANN, R. W. et al. Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, Leiden, v.132, p.101-108, 2010.
- BRAGA, T. V. et al. Antioxidant, Antibacterial and Antitumor Activity of Ethanolic Extract of the *Psidium guajava* Leaves. **American Journal of Plant Sciences**, v.5, p.3492-3500, 2014.
- CARVALHO JR, A. R. et al., Constituintes químicos e atividade antioxidante de folhas e galhos de *Eugenia copacabanensis* Kiaersk (Myrtaceae). **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 477-482, 2014.
- CASTRO, M. R. et al. Essential oil of *Psidium cattleianum* leaves: Antioxidant and antifungal activity. **Pharmaceutical Biology**, p.1–9, 2014.
- CHAVASCO, J. M. et al. Evaluation of antimicrobial and cytotoxic activities of plant extracts from southern Minas Gerais Cerrado. **Revista Instituto Medicina tropical de São Paulo**, vol.56, n.1, p.13-20, 2014.
- CHETIA, J. et al. Phenolic content, anti-oxidant and antimicrobial activity and nutritive value of yong twig of *Psidium guajava* Linn. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.6, n.2, 2014.
- CITOGU, G. S.; ALTANLAR, N. Antimicrobial activity of some plants used in folk medicine. **Journal Herb Pharmacotherapy**, v.32, n.3, p.159-163, 2003.
- DALL'AGNOL, R. et al. Antimicrobial activity of some Hypericum species. **Phytomedicine**, v.10, p.511-6, 2003.
- DELGADO-ADÁMEZ, J. et al. *In vitro* assays of the antibacterial and antioxidant activity of aqueous leaf extracts from different *Prunus salicina* Lindl. cultivars. **Food and Chemical Toxicology**, v.50, p.2481–2486, 2012.
- EGGA, E.S. et al. Preliminary Phytochemical, Antimicrobial and Proximate Analysis of Tender Leaves of *Psidium guajava* L in Jos, Plateau State, Nigeria. **Asian Review of Environmental and Earth Sciences**, v.1, n.2, p.35-38, 2014.
- FABRY, W. et al. Antibacterial activity of East African medicinal plants. **Journal Ethnopharmacol**, v.60, p.79-84, 1998.
- FERNANDES, M. R. V. et al. Assessment of Antioxidant Activity of Spray Dried Extracts of *Psidium guajava* Leaves by DPPH and Chemiluminescence Inhibition in Human Neutrophils. **BioMed Research International**, p.10, 2014.
- FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. 2. ed. Porto Alegre, Artmed, 2013.
- GABRIELSON, J. et al. Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. **Journal of Microbiological Methods**, v.50, p.63 – 73, 2002.
- GERMANO, P. M. L., GERMANO, M. I. S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. 4. ed. Barueri, SP: Manole, 2011.
- HAMILL, F. A. et al. Traditional herbal drugs of Southern Uganda, II: literature analysis and antimicrobial assays. **Journal of Ethnopharmacology**, v.84, p.57–78, 2003.
- HEMA, R. et al. Antimicrobial Activity of Some of the South-Indian Spices and Herbals Against Food Pathogens. **Global Journal of Pharmacology**, v.3, n.1, p.38-40, 2009.
- HENIE, E. F. P. et al. Bacterial membrane disruption in food pathogens by *Psidium guajava* leaf extracts. **International Food Research Journal**, v.16, p.297-311, 2009.
- HOLETZ, F. B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, n.7, p.1027-1031, 2002.

- ITHARATA, A. et al. In vitro cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. **Journal of Ethnopharmacology**, v.90, p.33–38, 2004.
- JOHN, K. M. M. et al. Metabolic Variations, Antioxidant Potential, and Antiviral Activity of Different Extracts of *Eugenia singampattiana* (an Endangered Medicinal Plant Used by Kani Tribals, Tamil Nadu, India) Leaf. **BioMed Research. International**, v.2014, Article ID 726145, p.11, 2014.
- KUBER, B. R. et al. Phytochemical screening *In vitro* Anti-bacterial and Antioxidant activity of the *Psidium guajava* root bark. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v.2, n.10, p.238-248, 2013.
- LAPCIK, O. et al. Identification of isoflavones in *Acca sellowiana* and two *Psidium* species (Myrtaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v.33, p.983-992, 2005.
- LEE, O.H., LEE, B.Y. Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. **Bioresource Technology**, n.101, p.3751–3754, 2010.
- MAGINA, M. D. et al. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of *Eugenia* species. **Journal of Natural Medicines**, v.63, n.3, p.345-350, 2009.
- MAHMOUD, T. S. et al. *In vitro* cytotoxic activity of Brazilian Middle West plant extracts. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.21, n.3, p.456-464, 2011.
- MOHANAKRISHNAN, M. et al. Composition and antimicrobial activities of the essential oil from *Eugenia uniflora* L. leaves growing in India. **International Journal Biomedical Pharmaceutical Sciences**, v.4, n.1, p.46-49, 2013.
- MORENO, M. A. et al. Phytochemical Composition and Antioxidant Capacity of *Psidium guajava* Fresh Fruits and Flour. **Food and Nutrition Sciences**, v.5, p.725-732, 2014.
- NAIR, R.; CHANDA, S. *In vitro* antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. Leaf extracts against clinically important pathogenic microbial strains. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 452-458, 2007.
- NCCLS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. NCCLS document M7-A7. *Approved Standard—Seventh Edition*, which describes standard broth dilution (macrodilution and microdilution) and agar dilution techniques for measuring the in vitro susceptibility of bacteria to antimicrobial agents, 2006.
- REYNERTSON, K. A. et al., Antioxidant Potential of Seven Myrtaceous Fruits. **Ethnobotany Research & Applications**, v. 3; p. 25-36, 2005.
- RICHARD, F. T. et al. Effect of aqueous extract of leaf and bark of guava (*Psidium guajava*) on fungi *Microsporium gypseum* and *Trichophyton mentagrophytes*, and bacteria *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. **Advancement in Medicinal Plant Research**, v.1, n.2, p.45-48, Junho-2013.
- RIEDEL, G. **Controle Sanitário dos Alimentos**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.
- SANCHEZ, N. R. et al. An Evaluation of Antibacterial Activities of *Psidium guajava* (L.). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.48, n.3, p.429-436, 2005.
- SEO, J. et al. Study to find the best extraction solvent for use with guava leaves (*Psidium guajava* L.) for high antioxidant efficacy. **Food Science & Nutrition**, v.2, n.2, p.174–180, 2014.
- SETTHARAKSA, S. et al. Effect of solvent types on phenolic, flavonoid contents and antioxidant activities of *Syzygium gratum* (Wight) S. N. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.6, n.2, 2014.
- SILVA, C. J. et al. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de espécies de Myrtaceae plantadas no Brasil. **Química Nova vol.33 no.1 São Paulo 2010 Nova**, v.33, n.1, 2010. **Chemical composition and antibacterial activities from the essential oils of myrtaceae species planted in Brazil**
- SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre, 2004.
- SOUZA, G.C. et al. Ethnofarmacology studies of antimicrobial remedies in south of Brasil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.90, p.135-143, 2004.
- SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J. M. Assays related to cancer drug discovery. In: Hostettmann K, (ed.). **Methods in plant biochemistry: assays for bioactivity**. London: Academic Press, p.71-133, 1990.
- TANAKA, J. C. A. et al. Constituintes químicos de *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae). **Química Nova**, v.5, p.834-7, 2005.
- THAKUR, N.; ARYA, V. Preliminary Phytochemical Analysis of the Extracts of *Psidium* Leaves. **Journal of Scientific Research**, v.19, n.11, p.1421-1424, 2014.
- TONDO, E. C.; BARTZ, S. **Microbiologia e Sistemas de Gestão da Segurança de Alimentos**. Porto Alegre: Sulina, 2011.
- TRESINA, P. S.; MOHAN, V. R. Preliminary phytochemical, FT- IR and antibacterial assessment of leaf of *Eugenia singampattiana* Bedd (Myrtaceae). **International Journal of Advanced Research**, v.2, n.3, p.780-787, 2014.
- TURKMEN, N. et al. Effect of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. **Food Chemistry**, v.99, p.838-841, 2006.
- VUOTTO, M. L. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of Feijoa sellowiana fruit. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.13, p.197-201, 2000.
- WESTON, R. J. Bioactive products from fruit of the feijoa (*Feijoa sellowiana*, Myrtaceae): A review. **Food Chemistry**, v.121, p.923–926, 2010.
- WILLIAMS, R. J.; HEYAMNN. Containment of antibiotic resistance. **Science**, v.279, p.1153-1154, 1998.