

CENTRO UNIVERSITÁRIO UNIVATES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTU SENSU*
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE
EUGENIA ANOMALA E *PSIDIUM SALUTARE* (MYRTACEAE)
FRENTES À *ESCHERICHIA COLI* E *LISTERIA MONOCYTOGENES***

Eveline Simonetti

Lajeado, janeiro de 2015

Eveline Simonetti

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE
EUGENIA ANOMALA E *PSIDIUM SALUTARE* (MYRTACEAE)
FRENTE À *ESCHERICHIA COLI* E *LISTERIA MONOCYTOGENES***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, do Centro Universitário UNIVATES, como parte da exigência para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Dr. Eduardo Miranda Ethur
Co-orientador: Dra. Elisete Maria de Freitas

Lajeado, janeiro de 2015

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a meus familiares e esposo que sempre estiveram ao meu lado nesta caminhada e, apesar dos contratempos, me apoiaram e acreditaram no meu potencial.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela saúde, força e fé recebidas para a finalização desta etapa e pela vida dos meus familiares e esposo para estarem perto de mim.

A minha mãe, Mara Teresinha Ledur Simonetti, e meu pai, Jandir Simonetti, primeiramente pela minha vida e educação, pelo amor, cuidado e confiança que sempre tiveram e acima de tudo a paciência e compreensão.

A meu esposo, Ismael Carlos Joanela, pelo amor, incentivo, encorajamento constante, apoio, paciência durante estes dois anos, pois houve dias difíceis que sempre foram aliviados com seu carinho e cuidado.

A minha irmã, Bárbara Luísa Simonetti, e meu irmão, Ezequiel Simonetti, pelo amor, carinho, força, paciência e apoio.

A meu orientador, Eduardo Miranda Ethur, pelo auxílio, competência e confiança.

Ao Grupo de Estudo e Pesquisa de Plantas Naturais, Alana Ledur, Ana Caroline Giacomini, Bárbara Buhl, Kélen Arossi e Leandra Pacheco pelo auxílio durante a execução do trabalho.

Aos professores que sanaram dúvidas e auxiliaram na realização de testes, bem como seus bolsistas.

“Lute com determinação, abrace a vida com paixão, perca com classe e vença com ousadia, porque o mundo pertence a quem se atreve e a vida é muito para ser insignificante.”

Charles Chaplin

RESUMO

As doenças transmitidas por alimentos ocorrem por diversos motivos sendo principalmente devido à ingestão de alimentos contaminados por microrganismos patogênicos, dentre eles a *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*. Uma das alternativas que vêm sendo estudada para minimizar a contaminação é o emprego de plantas como antimicrobiano de origem natural em produtos alimentícios. Desta forma o objetivo do presente estudo foi fornecer dados científicos a respeito de duas plantas nativas do RS ainda não estudadas, *Eugenia anomala* e *Psidium salutare*, para um potencial emprego como 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, a capacidade antioxidante dos extratos por meio do método de redução do radical 1,1-difenil-2-picrilidrazil (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 vegetais possuem ação antioxidante comparável a do padrão. Quanto à atividade antimicrobiana, somente o extrato hexânico de *P. salutare* apresentou tal ação sendo ela moderada (CIM=312,5 µg/mL) e à citotoxicidade todos os extratos apresentaram ação citotóxica sendo que o extrato clorofórmico de *E. anomala* e hexânico de *P. salutare* apresentaram elevada ação e os demais extratos moderada ação citotóxica a uma concentração de 100 µg/mL. Assim, o presente estudo demonstrou que as espécies vegetais estudadas apresentam potencial para emprego em antimicrobiano sendo necessária a otimização do processo de extração.

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

ABSTRACT

The foodborne diseases occur for various reasons and mainly due to the ingestion of food contaminated by pathogenic micro-organisms, including *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. One of the alternatives that have been studied to minimize contamination is the use of plants as an antibacterial of natural origin in food products. Therefore, 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 job potential as natural antimicrobial in food. To this end, we evaluated the antimicrobial activity of extracts of E. and P. anomala salutare against *E. coli* and *L. monocytogenes* by determining the minimal inhibitory concentration (MIC) by the broth microdilution method, the antioxidant activity of the extracts by means of method of reducing the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical and in vitro cytotoxicity using CHO-K1 cells. The results showed that the extracts of ethyl acetate and ethanol of both species have antioxidant activity comparable to the standart. As for antimicrobial activity, only the hexane extract of *P. salutare* showed such action being her moderate (MIC = 312.5 µg/mL) and cytotoxicity all extracts showed cytotoxic action of which the chloroform extract of *E. anomala* and hexane *P. salutare* presented high action and the other moderate cytotoxic action extracts at a concentration of 100 µg/mL. Thus, the present study showed that plant species have potential for use in antimicrobial requiring the optimization of the extraction process.

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

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Folhas e frutos da espécie <i>E. anomala</i>	30
Figura 2 - Folhas e frutos da espécie <i>P. salutare</i>	31
Figura 3 - Reação do radical livre DPPH frente a um agente antioxidante	33
Figura 4 - Estrutura química do Cloranfenicol	36
Figura 5 – Concentrações empregadas para a avaliação da atividade antioxidante.	41
Figura 6 – Placa para determinação da concentração inibitória mínima dos extratos	46
Figura 7 – Comparativo do rendimento (%) dos extratos vegetais de <i>E. anomala</i> e <i>P. salutare</i>	53
Figura 8 - Autobiografia dos extratos de <i>E. anomala</i>	54
Figura 9 - Autobiografia dos extratos de <i>P. salutare</i>	55
Figura 10 - CCD dos extratos de <i>E. anomala</i> e <i>P. salutare</i> empregando-se diferentes graus de eluição	56
Figura 11 e 12 - Atividade antioxidante dos extratos de <i>E. anomala</i> e <i>P. salutare</i> em comparação ao padrão ácido ascórbico, respectivamente	57
Figura 13 - Concentração inibitória mínima dos extratos de <i>E. anomala</i> contra <i>E. coli</i>	62
Figura 14 - Concentração inibitória mínima dos extratos de <i>P. salutare</i> contra <i>E. coli</i>	63
Figura 15 - Concentração inibitória mínima dos extratos de <i>E. anomala</i> contra <i>L. monocytogenes</i>	63

Figura 16 - Concentração inibitória mínima dos extratos <i>P. salutare</i> contra <i>L. monocytogenes</i>	64
Figura 17 - Concentração bactericida mínima dos extratos de <i>E. anomala</i> e <i>P. salutare</i> frente a <i>E. coli</i>	65
Figura 18 - Concentração bactericida mínima dos extratos de <i>E. anomala</i> frente a <i>L. monocytogenes</i>	66
Figura 19 - Concentração bactericida mínima dos extratos de <i>P. salutare</i> frente a <i>L. monocytogenes</i>	66
Figura 20 - Comparação da CIM dos extratos de <i>E. anomala</i> e <i>P. salutare</i> frente a <i>E. coli</i> e <i>L. monocytogenes</i>	69
Figura 21 - Perfil citotóxico dos extratos de <i>E. anomala</i> e <i>P. salutare</i>	83

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Linhagens patogênicas de <i>E. coli</i>	22
Quadro 2 - Fatores de virulência envolvidos na infecção por <i>L. monocytogenes</i>	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Rendimentos (%) dos extratos utilizados no estudo.....	52
Tabela 2 - Atividade antioxidante (IC50) dos extratos de <i>E. anomala</i> e <i>P. salutare</i> e respectivo SEM	58
Tabela 3 - Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima dos extratos de <i>E. anomala</i> e <i>P. salutare</i> frente à <i>E. coli</i>	67
Tabela 4 - Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima dos extratos de <i>E. anomala</i> e <i>P. salutare</i> frente à <i>L. monocytogenes</i>	68
Tabela 5 – Morte celular (%) provocado pelos extratos de <i>E. anomala</i> e <i>P. salutare</i> 100 µg/mL	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CDTX	Toxinas Formadoras de Poros Colesterol Dependentes
CHO	Ovário de Hamster Chinês
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DATASUS	Departamento de Informática do SUS
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	1,1-difenil-2-picrilidrazil
DTAs	Doenças Transmitidas por Alimentos
FAO	Food Agricultural Organization
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
H	Hidrogênio
INC	Instituto Nacional Americano de Câncer
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
LLO	Listeriolisina O
MCN	Museu de Ciências Naturais
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Solução Tampão Fosfato Salina
SFB	Soro Bovino Fetal
SUH	Síndrome Urêmica Hemolítica

SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TTC	Cloreto de trifeniltetrazólio
L	Litro
mL	Mililitro
µL	Microlitro
mg	Miligrama
µg	Micrograma
g	Grama
µm	Micrômetros
%	Porcentagem
UV	Ultravioleta
pH	Potencial hidrogeniônico
UFC	Unidade Formadora de Colônia
AA%	Percentual de Atividade Antioxidante

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 Contaminação dos alimentos.....	18
2.2 Patógenos estudados	20
2.2.1 <i>Escherichia coli</i>	20
2.2.2 <i>Listeria</i>	23
2.2.2.1 Patogenia da infecção pela <i>L. monocytogenes</i>	24
2.2.2.2 Manifestações clínicas da contaminação por <i>L. monocytogenes</i>	27
2.3 Espécies vegetais estudadas	29
2.3.1 Família Myrtaceae.....	29
2.3.2 <i>Eugenia anomala</i> D. Legrand.....	30
2.3.3 <i>Psidium salutare</i> var. <i>sericeum</i> (Cambess.) Landrum.....	31
2.4 Ensaio realizados com as espécies <i>E. anomala</i> e <i>P. salutare</i>	32
2.4.1 Atividade antioxidante	32
2.4.2 Atividade antimicrobiana	34
2.4.3 Citotoxicidade <i>in vitro</i>	36
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
3.1 Material vegetal	38
3.1.1 Coleta e identificação	38

3.1.2 Obtenção dos extratos	38
3.1.3 Determinação do rendimento dos extratos.....	39
3.1.4 <i>Screening</i> dos extratos.....	39
3.2 Atividade antioxidante.....	40
3.3 Atividade antimicrobiana.....	42
3.3.1 Culturas microbianas.....	43
3.3.2 Diluição dos extratos	43
3.3.3 Padrão antimicrobiano	43
3.3.4 Controle do diluente	44
3.3.5 Ressuspensão dos microrganismos.....	44
3.3.6 Preparo e padronização dos inóculos	44
3.3.7 Concentração inibitória mínima (CIM).....	45
3.3.8 Confirmação da atividade inibitória mínima.....	47
3.3.9 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)	48
3.4 Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> dos extratos.....	48
3.4.1 Cultura da linhagem celular.....	48
3.4.2 Método de repique e viabilidade celular	49
3.4.3 Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> pelo método de Alamar Blue	50
3.5 Análise estatística.....	51
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
4.1 Material vegetal	52
4.1.1 Rendimentos	52
4.1.2 <i>Screening</i> dos extratos.....	53
4.1.3 Atividade antioxidante	57
4.1.4 Atividade antimicrobiana	62
4.1.5 Citotoxicidade <i>in vitro</i>	82
5 CONCLUSÃO.....	85

PROPOSTA DE TRABALHOS FUTUROS.....	87
REFERÊNCIAS.....	88

1 INTRODUÇÃO

Com o desenvolvimento industrial e o crescente aumento na produção de alimentos em nível regional, nacional e mundial a preocupação com a ocorrência das Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) vem se ampliando, demonstrando a necessidade da criação de estratégias para a minimização e prevenção de tais doenças, uma vez que anualmente um número ainda inaceitável acomete seres humanos infectados por meio da ingestão de alimentos contaminados por diferentes patógenos (GERMANO & GERMANO, 2011; TONDO & BARTZ, 2011).

As doenças transmitidas por alimentos são conhecidas como toxinfecções que ocorrem devido à ingestão de alimentos contaminados por microrganismos patogênicos, objetos lesivos, substâncias químicas ou substâncias tóxicas presentes naturalmente nos alimentos (SILVA JR, 1995; RIEDEL, 2005).

Tais doenças apresentam características comuns como: curto período de incubação, provocam náuseas, vômitos, diarreia, dor abdominal e presença ou ausência de febre. Os pacientes podem, num curto período de tempo, apresentar melhora no quadro clínico, entretanto em indivíduos imunocomprometidos, idosos ou muito jovens estas doenças podem levar a complicações graves e conseqüentemente a morte. As DTAs são responsáveis por milhares de hospitalizações, centenas de mortes e muitas vezes complicações irreversíveis (SILVA JR, 1995; RIEDEL, 2005; GERMANO & GERMANO, 2011).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), nos países em desenvolvimento são detectados por ano mais de um bilhão de casos de diarreia

aguda em crianças menores de cinco anos e destas, aproximadamente 5 milhões morrem, sendo que uma das principais causas é a ingestão de alimentos contaminados por bactérias. De acordo com os dados da Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), no Brasil, entre os anos de 1999 a 2008, houve 6.062 surtos de DTAs, levando a 117.330 doentes e 64 mortes (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). *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* serão o foco do presente estudo.

A *Escherichia coli* é uma bactéria Gram-negativa, estando presente naturalmente no trato gastrintestinal de humanos e animais, sendo que dentre seus diversos sorotipos, somente cinco são identificados como patogênicos. Tal bactéria é amplamente utilizada como marcador em estudos e análises de contaminação fecal da água, pois é facilmente isolada e identificada. A contaminação por este patógeno pode provocar quadro clínico de diarreia, febre, vômitos e outras complicações que podem levar ao óbito indivíduos recém-nascidos e crianças, imunocomprometidos ou idosos (JAY, 2005; FORSYTHE, 2013).

A *Listeria monocytogenes* é um patógeno que causa sérios malefícios à saúde da população quando ingeridos alimentos contaminados podendo levar a um estado patológico denominado de listeriose. Este pode provocar sintomas agudos como, por exemplo, os similares aos da gripe, dores fortes de cabeça, febre, vômitos e náuseas e ainda causar complicações crônicas como: meningite, encefalite, septicemia, osteomielite, endocardite, abortos, natimortos e até mesmo a morte. A listeriose apresenta altas taxas de mortalidade: 70% nos casos de meningite, 50% nos casos de septicemia e acima de 80% em infecções perinatais-neonatais. Os indivíduos mais susceptíveis a contrair a listeriose são os idosos, gestantes, fetos e recém-nascidos contaminados através da mãe durante a gravidez, e pessoas com o sistema imune comprometido (MANTILLA et al., 2007; FORSYTHE, 2013).

Este patógeno está amplamente distribuído na natureza, podendo ser encontrado em diversos alimentos, sejam eles crus ou processados. Está presente principalmente em materiais e equipamentos empregados na produção e preparo de alimentos quando há má higienização dos mesmos propiciando a aderência do microrganismo às superfícies e o início da sua multiplicação celular. Dentre os alimentos em que a *Listeria monocytogenes* pode ser encontrada estão: queijos, leites, carnes e seus derivados, vegetais frescos, salsichas de carne crua fermentada, pescados e frutos do mar (ALEJANDRA et al., 2013; FORSYTHE, 2013).

Devido à grande relevância e prejuízo que a contaminação por estes patógenos apresenta, a pesquisa por alternativas para inibi-las se torna importante no meio científico, pois, pode fornecer meios às indústrias alimentícias e à população de evitar a contaminação dos alimentos que serão ingeridos. A contaminação por microrganismos em alimentos foi avaliada pelo Comitê de Segurança Alimentar (FAO/OMS) como um problema generalizado de saúde mundial (SILVA et al., 2010).

Desta forma, o desenvolvimento de pesquisas acerca 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, por exemplo, plantas da família Myrtaceae, as quais pertencem as espécies *Eugenia anomala* e *Psidium salutare*, 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 e emprego de antimicrobianos de origem vegetal (WILLIAMS & HEYAMN, 1998; CITOGLU & ALTANLAR, 2003; HAMILL et al., 2003; SILVA et al., 2010).

Deste modo, a busca por alternativas que visam minimizar ou eliminar o risco da ocorrência de infecção por *E. coli* e *L. monocytogenes* através da aplicação de produtos antimicrobianos advindos de plantas são de grande relevância no meio científico. Assim, o presente estudo avaliou a atividade antimicrobiana de extratos de *Eugenia anomala* e *Psidium salutare* contra *E. coli* e *L. 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.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Contaminação dos alimentos

O desenvolvimento industrial vem causando a migração da população rural para a zona urbana e com este aumento populacional há aumento na necessidade de quantidade maior de alimentos e amplia a distância entre os produtores e consumidores dos alimentos. Além disso, houve mudança expressiva nos hábitos alimentares dos indivíduos que devido ao tempo reduzido, procuram alimentos de fácil preparo e aquisição sendo muitas vezes fora do domicílio (RIEDEL, 2005; GERMANO & GERMANO, 2011).

Com esta mudança no perfil dos consumidores de alimentos, surge a necessidade do segmento alimentício, a nível mundial, de fornecer produtos de qualidade e seguros ao consumidor. Para tanto é imprescindível que haja qualidade desde a matéria-prima, higiene das instalações, equipamentos e utensílios empregados na produção dos alimentos, cuidados no momento do preparo, métodos de conservação utilizados e demais cuidados relacionados à cadeia que envolve desde a aquisição dos insumos até a venda ao consumidor (RIEDEL, 2005; TONDO & BARTZ, 2011).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é o órgão competente que visa promover a proteção da saúde da população através do controle sanitário da produção e comercialização de produtos e serviços (GERMANO & GERMANO, 2011).

Os alimentos são contaminados principalmente através de três reservatórios sendo eles: as águas superficiais, o solo e o homem e os animais (principalmente pelo trato intestinal). Tais reservatórios apresentam naturalmente microrganismos na maioria das vezes inofensivos e não patogênicos, entretanto podem apresentar pequena quantidade de microrganismos patogênicos que podem causar danos à saúde dos consumidores de alimentos contaminados (RIEDEL, 2005).

Assim, surgem as Doenças Transmitidas por Alimentos que tratam-se de doenças causadas pela ingestão de alimentos contaminados por perigos biológicos (bactérias e protozoários), físicos (pedaços de metais, vidros, insetos, ossos, fios de cabelo, etc) ou químicos (resíduos de saneantes, metais pesados, antimicrobianos, etc). Estas doenças podem ser prevenidas através de campanhas educativas que demonstrem os riscos da aquisição de alimentos de origem duvidosa, além de como identificar alimentos de má qualidade ou deteriorados (SILVA JR, 1995; TONDO & BARTZ, 2011).

Os alimentos podem apresentar estabilidade frente ao ataque de microrganismos devido à presença de substâncias naturais presentes em sua constituição que possuem atividade antimicrobiana, como por exemplo: o cravo-da-índia (eugenol), a canela (eugenol e aldeído cinâmico), a sálvia (timol e eugenol), o alho (alicina), o orégano (carvacrol), entre outros (JAY, 2005; GERMANO & GERMANO, 2011). Devido à maior demanda por alimentos processados fáceis e rápidos para preparar, a indústria alimentícia busca tecnologias alternativas para o processamento dos alimentos de forma a reduzir ou eliminar possíveis patógenos presentes. Para tanto, um destes antimicrobianos são os óleos essenciais e extratos de plantas que em sua constituição apresentam substâncias com tal atividade (BURT, 2004; OSTROSKY et al., 2008).

2.2 Patógenos estudados

2.2.1 *Escherichia coli*

E. coli pertence à família das enterobactérias e gênero *Escherichia*, trata-se de uma bactéria Gram-negativa, não esporulada, anaeróbia facultativa, pode crescer em pH 4,4 a 9,0, capaz de fermentar a glicose e lactose, sendo um dos patógenos mais comuns presentes no trato intestinal humano. É um patógeno de origem alimentar que foi reconhecida em 1971 quando ocorreu cerca de 400 casos de gastroenterite pela contaminação por uma linhagem enteroinvasiva veiculada por queijos importados comercializados em estados americanos (JAY, 2005; RIEDEL, 2005; TORTORA et al., 2012).

Pertence ao grupo dos microrganismos psicotróficos onde a temperatura mínima de desenvolvimento é de -5 °C a 5 °C, a temperatura ótima é de 25 a 30 °C e a temperatura máxima de 30 a 35 °C, podendo gerar enzimas proteolíticas e lipolíticas termoresistentes mantendo-se ativos após o processo de pasteurização (GERMANO & GERMANO, 2011; TONDO & BARTZ, 2011).

Está presente nas fezes de animais de sangue quente e do homem e em águas de lagos, rios, poços e nascentes. Ainda, pode ser encontrada numa variedade de alimentos, como: carnes, aves, pescados e verduras mal cozidos, hortaliças regadas com água contaminada, água, maionese de legumes, sobremesas (contaminação durante preparo), farofas, queijos, lasanhas, leite, saladas, sucos frescos de maçã ou cidra, iogurtes, milho cozido, pepinos, dentre outros (JAY, 2005; FORSYTHE, 2013).

A transmissão para os humanos acontece principalmente pelo consumo de alimentos contaminados, onde a contaminação pode ocorrer devido ao uso de utensílios não desinfetados, mãos não higienizadas entre a manipulação de diferentes alimentos e após a ida ao banheiro e ainda, por contaminação cruzada entre alimentos crus e cozidos. Também há evidências de haver transmissão deste

patógeno através do contato direto entre pessoas (SILVA JR, 1995; GERMANO & GERMANO, 2011; FORSYTHE, 2013).

A presença deste microrganismo em alimentos ou na água é indício de contaminação fecal. Apresenta a capacidade de multiplicar-se em superfícies de equipamentos e utensílios utilizados na produção de alimentos e em resíduos de alimentos (SILVA JR, 1995; GERMANO & GERMANO, 2011).

Apesar de não ser um patógeno de ocorrência comum pode ser a causa de infecções do trato urinário e, por algumas produzirem enterotoxinas, causam diarreia do viajante e raramente doenças de origem alimentar graves. O período de incubação é de 12 a 72 horas e a duração da doença de 2 – 7 dias (TONDO & BARTZ, 2011; FORSYTHE, 2013).

Para tornar-se patogênica, a bactéria transporta plasmídeos que codificam a produção de toxinas e a fixação bacteriana às células intestinais, ainda pode apresentar genes de resistência os quais, ao acumular-se num único plasmídeo, podem gerar resistência a antimicrobianos como, por exemplo: sulfonamidas, cloranfenicol, estreptomicina e tetraciclina (TORTORA et al., 2012).

Apresenta cerca de 200 sorotipos, sendo que a divisão das linhagens patogênicas da *E. coli* é definida de acordo com os sintomas clínicos, os mecanismos de patogenicidade e os efeitos em certas culturas de células conforme descrito a seguir no Quadro 1:

Quadro 1- Linhagens patogênicas de *E. coli*

Grupo	Características de adesão e invasão	Toxinas	Sintomas da doença
Enterohemorrágica (EHEC)	Aderem-se fortemente, ligam-se e invadem.	Verotoxinas (Shigatoxinas).	Diarreia sanguinolenta, colite hemorrágica, síndrome urêmica hemolítica (SUH) e púrpura trombocitopênica.
Enteroinvasiva (EIEC)	Invadem as células do cólon e propagam-se lateralmente às células adjacentes.	Não foram detectadas toxinas semelhantes à shigatoxina.	Febre e diarreia profusa contendo muco e sangue.
Enterotoxigênica (ETEC)	Aderência uniforme, não invasivas.	Termoestáveis (similar à toxina colérica e age nas células da mucosa) e termoestáveis.	Diarreia aquosa e febre baixa.
Enteropatogênica (EPEC)	Aderência em grupos e invadem as células hospedeiras, ligam-se e desaparecem.	Não aparentes.	Vômitos, diarreia aquosa contendo muco e febre.
Enteroadesiva (EAEC)	Aderência em grupos, mas não invadem.	Hemolisinas, verotoxinas (algumas linhagens) e toxinas semelhantes a toxinas termoestáveis.	Diarreia aquosa persistente e SUH (algumas linhagens).

Adaptado de Forsythe 2013.

A maioria dos surtos infecciosos causados por *E. coli* enterohemorrágica foi causada por linhagens O157:H7 sendo que a dose infectiva ainda é desconhecida. De acordo com os dados obtidos após surtos ela pode ser tão baixa quanto 10 células podendo causar enfermidades em crianças, idosos, jovens e imunocomprometidos. Em crianças pode causar complicações levando a um quadro clínico conhecido por SUH que provoca anemia hemolítica e insuficiência renal, sendo que em idosos pode ainda causar problemas neurológicos e febre (SILVA JR, 1995; FORSYTHE, 2013).

Uma das formas de prevenir a contaminação por *E. coli* é o cozimento adequado dos alimentos uma vez que tal bactéria apresenta sensibilidade térmica. Um exemplo é a carne moída, a qual deve ser cozida a 71,1 °C ou manter a temperatura do centro da mesma a no mínimo 68,3 °C por pelo menos 15 segundos. Outras medidas para controlar a infecção por este patógeno são: o armazenamento dos alimentos em temperaturas menores que 5 °C, o tratamento térmico superior a 70 °C, afastar pessoas doentes da produção de alimentos e evitar o contato entre alimentos cozidos e crus (JAY, 2005; ASSIS, 2011).

2.2.2 *Listeria*

O gênero *Listeria* é composto por bactérias Gram-positivas sendo elas bastonetes curtos, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, medindo de 0,4 – 0,5 μm de diâmetro e 0,5 – 2,0 μm de comprimento. Crescem a temperaturas que variam de -4 °C à 45 °C, tolerando ampla faixa de pH (4,4 – 9,4), além de sobreviverem a elevadas concentrações de NaCl (10%) (ALEJANDRA et al., 2013; FORSYTHE, 2013).

Estão amplamente distribuídas pela natureza podendo ocorrer isoladamente em cadeias curtas ou arranjos em ângulos formando “V” entre si ou em grupos, mantendo-se paralelos ao longo do eixo. Constituem este gênero as espécies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. grayi*, *L. innocua*, *L. weishimeri*, *L. marthii* e *L. rocourtiae*, sendo que somente as espécies *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* são patogênicas para o gado, pequenos ruminantes e seres humanos (ALEJANDRA et al., 2013; FORSYTHE, 2013).

A *L. monocytogenes* é uma bactéria Gram-positiva, β -hemolítica, catalase positiva, oxidase negativa, que hidrolisa a esculina, não esporulada e móvel. É um enteropatógeno que mede 0,5 x 1,5 μm , é aeróbio e anaeróbio facultativo, que possui diversos mecanismos adaptativos para sobreviver e desenvolver-se em condições ambientais adversas ou extremas como, por exemplo, a termorresistência, osmotolerância, tolerância a pH ácido e resistência a antimicrobianos e desinfetantes (JAY, 2005; LARRAIN & CARVAJAL, 2008; ALEJANDRA et al., 2013).

Esta bactéria é capaz de sobreviver no interior das células inclusive em células fagocíticas do sistema monócito-macrófago, conseguindo invadir e replicar-se nos fagócitos e células epiteliais. Pode suportar dessecação e ciclos repetitivos de congelamento e descongelamento, assim torna-se um perigo quando houver a ingestão de alimentos infectados por ela, estejam eles congelados, resfriados ou prontos para consumo (WHO/FAO, 2004; LARRAIN & CARVAJAL, 2008; TORTORA et al., 2012; FORSYTHE, 2013).

As bactérias pertencentes à espécie *L. monocytogenes* são diferenciadas através de sorotipificação conforme a diversidade a que pertence: antígeno somático e flagelar. Há descritos na literatura 13 sorotipos sendo eles: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 7. Destes, somente três (1/2a, 1/2b, 4b) são responsáveis por mais de 98% dos casos de listeriose em humanos (MENDONÇA, 2008; ALEJANDRA et al., 2013; FORSYTHE, 2013).

Estudos desenvolvidos no final da década de 1980 nas áreas de biologia celular, molecular e genômica elucidaram o mecanismo utilizado pela *L. monocytogenes* para invadir o hospedeiro, multiplicar e espalhar-se de célula para célula. Ainda, identificaram e caracterizaram os fatores de virulência envolvidos no ciclo intracelular e outros mecanismos reguladores que modulam a virulência, ficando estabelecido que a mesma pode servir como um modelo para estudo das interações patógeno-hospedeiro (ALEJANDRA et al., 2013).

A transmissão de *L. monocytogenes* ocorre principalmente através de alimentos contaminados, provocando um estado patológico muito grave conhecido como listeriose a qual acomete com maior agressividade indivíduos imunocomprometidos, recém-nascidos, gestantes e idosos (JAY, 2005; WERBROUCK et al., 2006; LARRAIN & CARVAJAL, 2008; TORTORA et al., 2012; ALEJANDRA et al., 2013; FORSYTHE, 2013).

2.2.2.1 Patogenia da infecção pela *L. monocytogenes*

O mecanismo envolvido na patogenia da infecção de *L. monocytogenes* é pouco conhecido sendo que os dados obtidos em estudos são advindos de experimentos em animais. Os alimentos são a principal via de aquisição deste patógeno sendo o trato gastrointestinal a primeira entrada da *L. monocytogenes* (JAY, 2005; ALEJANDRA et al., 2013; FORSYTHE, 2013). Uma das principais características é sua capacidade de atravessar as principais barreiras fisiológicas dos seres humanos, sendo elas: a barreira intestinal, hematoencefálica e placentária (WERBROUCK et al., 2006).

No momento que estas bactérias atravessam a barreira intestinal são absorvidas a partir do lúmen intestinal pelas células epiteliais e, caso o sistema imunológico não controle a infecção, elas continuarão a multiplicar-se podendo a infecção se disseminar pela corrente sanguínea e gânglios linfáticos. Entrando na corrente sanguínea, grande parte das bactérias atinge o baço e fígado podendo replicar-se dentro de macrófagos ou células epiteliais (JAY, 2005; WERBROUCK et al., 2006; ALEJANDRA et al., 2013).

Em indivíduos com resposta imune inata incapaz de controlar a replicação destas bactérias, as mesmas continuarão sua replicação, sendo que o hospedeiro sobreviverá somente se houver uma resposta imune adaptativa eficaz. Caso contrário, entrarão na corrente sanguínea, alcançarão o cérebro e placenta levando a infecções sistêmicas potencialmente letais. Devido à capacidade da *L. monocytogenes* em replicar-se no citoplasma das células infectadas e disseminar-se via célula-célula, consegue inibir a resposta imune (ALEJANDRA et al., 2013).

Os fatores de virulência envolvidos na infecção de *L. monocytogenes* são: adesão e invasão da célula hospedeira, vazamento do vacúolo, multiplicação intracelular e extracelular e disseminação e proliferação celular (RAMOS, 2009; ALEJANDRA et al., 2013; FORSYTHE, 2013). Diversos genes já foram identificados como atuantes nas diferentes etapas do processo de infecção deste patógeno os quais estão demonstrados no Quadro 2.

Quadro 2 - Fatores de virulência envolvidos na infecção por *L. monocytogenes*

Gene	Produto do Gene	Função
<i>Hly</i>	Listeriolisina O (LLO)	Lise do fagossoma
<i>PlcA</i>	Fosfatidilinositol fosfolipase C (PI-PLC)	Lise do fagossoma
<i>PlcB</i>	Fosfatidilcolina fosfolipase C (PC-PLC)	Lise do fagossoma
<i>Mpl</i>	Precursor zinco metaloprotease	Processa o precursor PC-PLC a sua forma ativa
<i>PrfA</i>	Fator regulador positivo A	Requerida para a expressão dos fatores de virulência de <i>Listeria monocytogenes</i>
<i>ActA</i>	Proteína indutora de adesão à actina	Participa na mobilidade intracelular
<i>Hpt</i>	Proteína transportadora de hexose fosfato	Requerido para crescimento intracelular
<i>InlA</i>	Internalina A	Participa na invasão celular
<i>InlB</i>	Internalina B	Molécula sinalizadora e participa da invasão celular
<i>InlC</i>	Internalina C	Proteína secretada contribui para virulência de <i>Listeria</i>
<i>InlJ</i>	Internalina J	Adesão celular contribui para virulência de <i>Listeria</i>

Fonte: Alejandra et al., 2013.

A listeriolisina (LLO) é a hemolisina da *L. monocytogenes* sendo uma proteína com 527 aminoácidos e codificada pelo gene *hly*. É classificada como uma citolisina pertencente à família das toxinas formadoras de poros colesterol dependentes (CDTX), ativa em pH baixos (4,5 – 6,5), a qual determina a capacidade hemolítica da bactéria (FRANCO & LANDGRAF, 1996; CRUZ et al., 2008; ALEJANDRA et al., 2013; MORENO, 2013).

Há uma forte correlação entre a capacidade hemolítica destas bactérias e a sua patogenicidade, assim a listeriolisina O é considerada um dos principais determinantes da infecção pela *L. monocytogenes*. Sua principal função é mediar a lise dos vacúolos primários e secundários que contém o patógeno por meio da formação de poros ou lesões nas membranas compostas por colesterol, para promover sua liberação permitindo que se multipliquem no citoplasma das células do hospedeiro (ALEJANDRA et al., 2013; MORENO, 2013).

A atividade hemolítica da *L. monocytogenes*, a qual produz hemólise evidente, é determinada através do cultivo de cepas da bactéria em ágar sangue cuja promove a β -hemólise que é visualizada pela formação de halo mais claro ao

redor das colônias (COLLINS & LYNE, 1989; JAY, 2005; CRUZ et al., 2008; FORSYTHE, 2013; MORENO, 2013).

2.2.2.2 Manifestações clínicas da contaminação por *L. monocytogenes*

A listeriose é uma doença causada pela *L. monocytogenes* que afeta principalmente neonatos, gestantes, idosos e indivíduos imunodeprimidos, podendo acometer também portadores de diabetes mellitus, de doenças cardiovasculares e renais. Os indivíduos saudáveis possuem anticorpos contra este patógeno uma vez que o mesmo encontra-se naturalmente no trato intestinal (BARANCELLI et al., 2011; ALEJANDRA et al., 2013; FORSYTHE, 2013).

A dose infectiva depende do número de microrganismos ingeridos bem como da susceptibilidade do hospedeiro (MCLAUCHIN et al., 2004). Conforme Jemmi e Stephan (2006) a quantidade de microrganismos ingerida necessária para ocorrer infecção é de 10^2 - 10^9 unidades formadoras de colônia (UFC) dependendo do estado imunológico do indivíduo. Segundo a Comissão do Codex para Higiene dos Alimentos (1999) a concentração de *L. monocytogenes* que pode estar presente em cada grama de alimento consumido não deve exceder a 100 células, representando assim baixo risco ao consumidor.

Após a contaminação o período de incubação e o aparecimento dos sintomas é longo, podendo variar de 10 - 70 dias, o que leva a dificuldade de identificação da origem da contaminação. O quadro clínico é específico para cada grupo de risco onde, nos imunodeprimidos, a infecção acomete principalmente o sistema nervoso central, podendo provocar endocardite e infecções nas articulações, fígado e pulmões. Em gestantes, a infecção provoca sintomatologia característica de estado gripal sendo que no primeiro trimestre de gestação leva ao aborto, podendo diminuir os movimentos fetais e provocar parto prematuro. Outra forma de infecção por este patógeno é a não invasiva a qual é limitada ao intestino que pode levar a gastroenterite febril (JAY, 2005; ANDRADE, 2008; BARANCELLI et al., 2011; FORSYTHE, 2013).

A presença de *L. monocytogenes* foi detectada num estudo realizado por Schwab e Edelweiss (2003) em 50 (33,78%) placentas humanas advindas de aborto das 148 analisadas, mostrando que este patógeno é contaminante de mulheres grávidas em grande número, mas que não é diagnosticado (CEZAR et al., 2013).

Nos neonatos a infecção pode ocorrer de duas formas clínicas: a precoce e a tardia. A precoce ocorre ainda durante a vida intra-uterina e a sintomatologia clínica surge com 36 horas após o parto, chamada de granulomatose infantisséptica. A forma tardia acontece 14 dias após o parto, onde a meningite é a principal manifestação, sendo que a fonte desta infecção não está estabelecida, porém acredita-se que ocorre durante o parto pelo canal da cérvix (JAY, 2005; MENDONÇA, 2008).

Mesmo a incidência de listeriose sendo baixa quando comparada a infecções causadas por outros patógenos como *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. ela apresenta um grande risco à saúde pública pois causa sequelas severas e alto índice de mortalidade (entre 20 – 30%). Atualmente, estima-se que nos países desenvolvidos o número de casos desta doença é de 2 – 15 casos por milhão de indivíduos (MANTILLA et al., 2007; MENDONÇA, 2008; ALEJANDRA et al., 2013; FORSYTHE, 2013).

Conforme dados do Departamento de Informática do SUS (DATASUS) (2009), no Brasil entre os anos de 1995 – 2007 foram diagnosticados 193 casos de listeriose, uma média de 14,8 casos anualmente. Diversos estudos realizados no Brasil comprovaram a presença de *L. monocytogenes* em leites, queijos e produtos cárneos, entretanto a contaminação não está restrita somente a estes alimentos (PERES et al., 2010).

2.3 Espécies vegetais estudadas

2.3.1 Família Myrtaceae

A família Myrtaceae é uma das mais importantes do Brasil sendo muitas vezes a família arbórea dominante na mata Atlântica (LANDRUM & KAWASAKI, 1997). É dividida em duas subfamílias, Myrtoideae (frutos carnudos) e Leptospermoideae. Possui cerca de 140 gêneros e 5.800 espécies desenvolvendo-se em diversos locais como Austrália, sudeste da Ásia e América do Sul (WILSON et al., 2001; WILSON et al., 2005; GOVAERTS et al., 2008; BIFFIN et al., 2010).

As principais características desta família são: presença de folhas simples, opostas e de bordos inteiros; flores brancas, bissexuadas, pequenas, tetrâmeras ou pentâmeras, auxiliares ou em racemos ou panículas; ramos inertes; casca lisa sendo normalmente clara; frutos, bagas ou drupas (SOBRAL et al., 2006).

Fazem parte da subfamília Myrtoideae diversas plantas economicamente importantes na área alimentícia, agrícola e ornamental como, por exemplo, especiarias como o cravo (*Syzygium aromaticum*), os frutos de *Psidium* (goiabas), *Eugenia*, *Plinia*, *Syzygium*, *Myrciaria* e *Luma* e a pimenta da Jamaica (*Pimenta dioica*) (REYNERTSON et al., 2005).

Plantas da família Myrtaceae apresentam elevada concentração de terpenos sendo que há variação qualitativa e quantitativa considerável de terpenos foliares em população e indivíduos, sendo esta variação importante ecologicamente e industrialmente (KESZEL et al., 2010).

Em estudo de Cruz & Kaplan (2004), no qual foi realizado um levantamento do uso medicinal das famílias Myrtaceae e Melastomataceae no Brasil, as plantas da família Myrtaceae foram as mais utilizadas para fins medicinais (71,4%). Tais plantas são administradas para o alívio de distúrbios gastrintestinais, doenças infecciosas e hemorrágicas, sendo que as partes mais utilizadas são cascas, folhas e frutos (normalmente consumidos).

2.3.2 *Eugenia anomala* D. Legrand

A subtribo Eugeninae é composta por aproximadamente 1.050 espécies e engloba os gêneros *Eugenia* e *Myrcianthes* as quais caracterizam-se por apresentar embrião eugenióide, com cotilédones espessos, separados e plano-convexos e o hipocótilo é uma curta protrusão ou possui os cotilédones fusionados parcial ou completamente. As inflorescências são dispostas em ramos bracteados normalmente com mais de sete óvulos e embriões sólidos, ainda apresenta cálice tetrâmero. Ocorre desde o México e Caribe até o norte da Argentina sendo que no Brasil há cerca de 350 espécies (LANDRUM & KAWAZAKI, 1997; LUCAS et al., 2007).

A espécie *Eugenia anomala* D. Legrand é conhecida popularmente como “uvaia-do-campo” sendo uma planta nativa do Rio Grande do Sul. Está distribuída principalmente nos campos rupestres e arenosos da Campanha e da Encosta Inferior do Nordeste. Trata-se de um subarbusto com folhas inteiras e altura aproximada de 20 cm, conforme mostra a Figura 1 (SOBRAL et al., 2006; GIEHL, 2012).

Figura 1 - Folhas e frutos da espécie *E. anomala*



Fonte: Do autor.

2.3.3 *Psidium salutare* var. *sericeum* (Cambess.) Landrum

Ao gênero *Psidium* pertencem os araçás (nativos) e as goiabeiras (exóticas) os quais estão amplamente distribuídos pelo Brasil e outros países da América do Sul. Seus frutos são atrativos e apresentam elevado teor de vitamina C. Além disso, algumas espécies pertencentes a este gênero estão despertando o interesse de indústrias farmacêuticas devido ao potencial antioxidante, à presença de vitaminas e óleo essencial que as constituem. Fazem parte deste gênero cerca de 100 espécies, das quais *P. guajava* (goiabeira) é a mais importante (FRANZON et al., 2009). Ocorrem no Sul do México até a Província de Buenos Aires (Argentina), Oeste das Índias (Ilhas do Caribe) e dois arquipélagos no Pacífico, as ilhas de Revillagigedo e Galápagos (LANDRUM & KAWAZAKI, 1997; FRANZON et al., 2009).

A espécie *Psidium salutare* var. *sericeum* (Cambess.) Landrum é conhecida popularmente por “araçá-do-campo” e é uma planta nativa do Rio Grande do Sul. Ocorre principalmente nos Campos de Cima da Serra, campos rupestres da Campanha, Planalto, Serra do Sudeste e Depressão Central. Trata-se de um subarbusto, com folhas simples e opostas e com densa pilosidade (GIEHL, 2012) conforme ilustrado na Figura 2.

Figura 2 - Folhas e frutos da espécie *P. salutare*



Fonte: Do autor.

2.4 Ensaios realizados com as espécies *E. anomala* e *P. salutare*

2.4.1 Atividade antioxidante

Antioxidantes são substâncias que apresentam a função de impedir que radicais livres causem danos às células e tecidos. Na indústria alimentícia, o interesse em empregar agentes antioxidantes naturais vem sendo uma tendência, sendo que os principais antioxidantes naturais empregados são os ácidos fenólicos, tocoferóis e extratos de plantas como salvia e alecrim. Os principais antioxidantes encontrados naturalmente em alimentos são os carotenoides, tocoferóis, ácido ascórbico e seus derivados e compostos fenólicos (taninos, flavonoides e ácidos fenólicos) (BELITZ & GROSCH, 1997; VELIOGLU et al., 1998; AMAROWICZ et al., 2004; RAMALHO & JORGE, 2006).

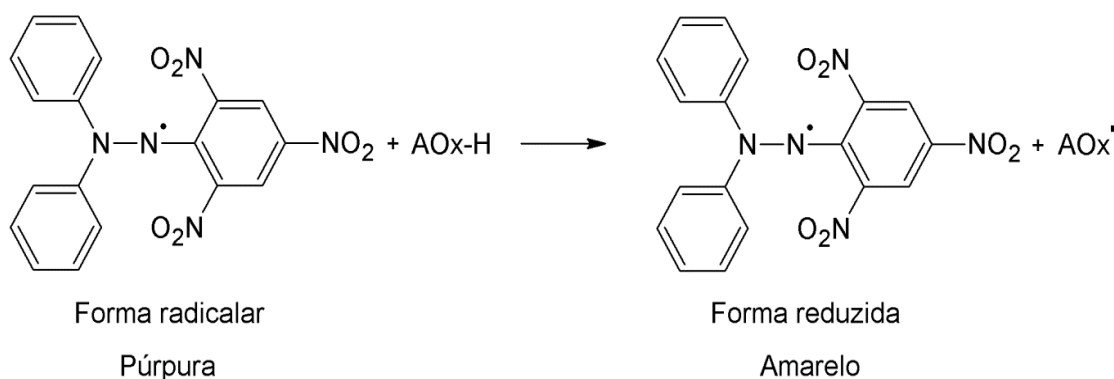
Diversos métodos podem ser empregados para a determinação da atividade antioxidante de extratos vegetais ou substâncias isoladas como o de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico, de sequestro do peróxido de hidrogênio, de sequestro do radical peroxil (método ORAC), de sequestro do radical superóxido - xantina oxidase, de sequestro do ácido hipocloroso (ALVES et al., 2010). Um dos métodos mais utilizados baseia-se na avaliação da atividade sequestradora do radical livre 2,2- difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) de coloração púrpura que absorve a 515 nm (BRAND-WILLIAMS et al., 1995).

O DPPH é um radical livre estabilizado pela ressonância do elétron desemparelhado que evita sua dimerização e inativação como radical livre. Quando na forma reduzida ele apresenta coloração diferente da oxidada, conforme ilustrado na Figura 3 permitindo a detecção dos processos de oxirredução de substâncias potencialmente antioxidantes (YADAV et al., 2011).

Quando houver a ação de um antioxidante, o DPPH é reduzido formando difenil-picril-hidrazina o qual apresenta coloração amarela levando ao

desaparecimento da absorção, a qual pode ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. Assim, a partir dos resultados obtidos é determinada a porcentagem de atividade antioxidante (%AA) que corresponde à quantidade de DPPH reduzida pelo agente antioxidante. A quantidade de antioxidante necessária para diminuir a concentração inicial de DPPH em 50% denomina-se concentração eficiente (CE50) ou concentração inibitória (CI50), assim, quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra menor será a CE50 e maior a atividade antioxidante (BRAND-WILLIAMS et al., 1995).

Figura 3 - Reação do radical livre DPPH frente a um agente antioxidante



Fonte: Do autor.

Os compostos antioxidantes, taninos e flavonoides, apresentam atividade antimicrobiana, cujo provável mecanismo de ação se dá devido à capacidade de inativação das enzimas e complexação com proteínas extracelulares, proteínas solúveis e com a parede das células das bactérias, sendo que a ruptura total das membranas bacterianas pode ser dada pela presença de flavonoides. Assim, pode-se sugerir que a presença destes compostos em extratos vegetais ou suas frações pode apresentar atividade antimicrobiana (FALCÃO et al., 2006).

Os taninos apresentam ação inibitória do crescimento de microrganismos, entretanto não há um mecanismo de ação bem definido (BEELEN et al., 2006). Um dos mecanismos propostos é a capacidade dos taninos solúveis em promover ligação com os componentes da parede celular das bactérias formando complexos indigestíveis ou inacessíveis às enzimas bacterianas, reduzindo a atividade enzimática com a inativação de importantes enzimas bacterianas ou modificando

microbiotas por meio da sua ação bacteriostática ou bactericida (NELSON et al., 1997).

Conforme estudos realizados por Bae e colaboradores (1993) e Jones e colaboradores (1994), os taninos agem sobre as bactérias provocando modificações morfológicas como a alongação das células, a formação de microcolônias aderentes e a presença de grande quantidade de material extracelular.

Os extratos vegetais e óleos essenciais vêm sendo estudados e aplicados na substituição de agentes antioxidantes sintéticos devido a sua capacidade de estabilizar a oxidação dos produtos alimentícios podendo aumentar a vida útil dos mesmos, e ainda inibir microrganismos patogênicos envolvidos nas doenças transmitidas por alimentos sendo uma alternativa eficaz no controle de microrganismos resistentes a antimicrobianos por meio da inibição do mesmo ou na interação sinérgica com antimicrobianos sintéticos (MOURA et al., 2013; RIBEIRO et al., 2013).

2.4.2 Atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana em extratos vegetais é realizada através da determinação da menor quantidade da substância em estudo necessária para inibir o crescimento do microrganismo sendo analisado. Além disso, pode ser empregado para a realização do primeiro *screening* na busca de novos agentes com atividades farmacológicas, sendo de grande relevância no Brasil, uma vez que possui enorme biodiversidade. Os métodos mais conhecidos para a avaliação da atividade antimicrobiana são: método de macrodiluição, método de microdiluição e método de difusão em ágar (OSTROSKY et al., 2008).

O método de microdiluição é empregado para determinar a concentração inibitória mínima (CIM), nele utiliza-se pequenos volumes de caldo que são adicionados a placas de plástico estéreis, específicas para microdiluição as quais contém poços de fundo redondo ou cônico (NCCLS, 2006).

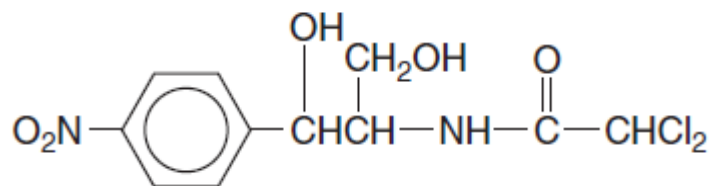
Este método é empregado para realizar um *screening* da atividade antimicrobiana de óleos essenciais, plantas ou substâncias puras. A turvação é indicativa da densidade bacteriana, assim, quando não há crescimento microbiano o meio permanece claro, caso contrário, o meio fica turvo. Portanto, o grau de inibição está relacionado com a turbidez do meio. Pode ser utilizado para avaliar a atividade antimicrobiana de amostras solúveis, insolúveis e óleos essenciais, além disso, é simples e rápido (RIOS et al., 1988).

A concentração inibitória mínima é a menor concentração de agente antimicrobiano capaz de inibir completamente o crescimento do microrganismo em estudo, conforme observado a olho nu ou por aparelhos que facilitem a leitura dos testes. Realizada a microdiluição o crescimento nos poços contendo o agente antimicrobiano deve ser comparado com o crescimento nos poços do controle de crescimento (isento da adição de antimicrobiano), sendo que para haver validade no teste é necessário ocorrer crescimento no poço do controle positivo (contém inóculo) e empregar-se uma comparação com um padrão antimicrobiano já conhecido (RIOS et al., 1988; NCCLS, 2006).

O cloranfenicol geralmente é empregado como padrão antimicrobiano. É um antibiótico produzido pelo *Streptomyces venezuelae* que foi isolado pela primeira vez em 1947 na Venezuela em amostra de solo e é classificado como anfenicol. Está representada na Figura 4 sua estrutura química (BRASIL, 2010; BRUNTON et al., 2012).

Possui ação bacteriostática de amplo espectro de ação sendo eficaz contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, clamídias, riquetsias e micoplasmas. Age inibindo a síntese proteica bacteriana e em menor grau em células eucarióticas. Liga-se de forma reversível à subunidade ribossômica 50S, impedindo a interação entre a peptidiltransferase e o substrato do aminoácido bloqueando a ligação ao peptídeo. Ele inibe também a síntese proteica nas mitocôndrias de mamíferos (BRUNTON et al., 2012).

Figura 4 - Estrutura química do Cloranfenicol



Fonte: Do autor.

Os extratos vegetais apresentam coloração característica que pode dificultar a visualização da turvação nos poços, assim emprega-se um revelador que modificará a coloração dos mesmos de acordo com sua ação. O trifeniltetrazólio (TTC) é um dos reveladores que pode ser empregado para auxiliar na leitura dos resultados nas placas. Trata-se de um indicador de oxirredução que pode ser utilizado na diferenciação de tecidos metabolicamente ativos dos não ativos e ainda para avaliar a viabilidade celular. Em tecidos vivos, devido à presença de diversas desidrogenases (enzimas envolvidas na oxidação dos compostos orgânicos e consequentemente no metabolismo celular) ocorre a redução enzimática do 2,3,5-trifeniltetrazólio (incolor) em 1,3,5-trifenilformazana (coloração avermelhada), assim é possível identificar se há microrganismo viável (GABRIELSON et al., 2002).

2.4.3 Citotoxicidade *in vitro*

A realização da avaliação citotóxica é muito importante na pesquisa de substâncias com atividade antimicrobiana apresentando menor toxicidade e maior seletividade. Para realiza-la, antes de proceder aos ensaios *in vivo*, faz-se análises em células eucarióticas (*in vitro*) e a partir disso, calcula-se o IC90 que é o índice que determina 90% de viabilidade celular, visualizado pela mudança de coloração do reagente empregado, alamar blue. A partir do IC90, calcula-se o IC50 que representa a concentração onde ocorre 50% de morte celular (PIETRO et al., 2000; ROLON et al., 2006).

O Alamar Blue, identificado como resazurina trata-se de um indicador colorimétrico com potencial redox, o qual em presença de células em proliferação

reduz-se. Quando apresenta-se na sua forma oxidada sua coloração é azul (não fluorescente/célula não é viável) e quando na forma reduzida sua coloração é rósea (célula viável/fluorescente) assim, sua redução indica proliferação celular que é indício de que as células estão consumindo oxigênio para seu metabolismo (COLLINS & FRANZBLAU, 1997; O'BRIEN et al., 2000; ROLON et al., 2006).

Trata-se de um teste eficiente, simples, sensível, rápido, seguro, não tóxico para as células e não necessita provocar morte celular para a obtenção dos resultados. Pode ser utilizado para avaliação da citotoxicidade, determinação da função mitocondrial e proliferação e viabilidade celular (O'BRIEN et al., 2000; PIETRO et al., 2000; BENERE et al., 2007).

Desta forma, devido aos sérios prejuízos à saúde que a contaminação por *E. coli* e *L. monocytogenes* provoca em humanos quando ingeridos alimentos contaminados por estes patógenos, aos danos financeiros causados nas indústrias alimentícias e ao aumento da preocupação mundial com a resistência microbiana aos antimicrobianos disponíveis no mercado, a busca por alternativas que minimizem a ocorrência da contaminação dos alimentos por microrganismos é de grande relevância e neste contexto o capítulo a seguir apresenta a metodologia desenvolvida no presente estudo a cerca das espécies vegetais *E. anomala* e *P. salutare*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

3.1.1 Coleta e identificação

A coleta do material vegetal foi realizada no município de Alegrete/RS no mês de novembro de 2013. Posteriormente, foi identificado pela bióloga Prof. Dra. Elisete Maria de Freitas e o material *voucher* está armazenado no Museu de Ciências Naturais da Univates (MCN), identificados pelos seguintes números de exsicata: *Eugenia anomala* (HVAT 4083) e *Psidium salutare* (HVAT 4051).

3.1.2 Obtenção dos extratos

Para a obtenção dos extratos vegetais primeiramente procedeu-se à seleção e limpeza das folhas de *E. anomala* e *P. salutare*, logo após a coleta. Em seguida, submeteu-se o material vegetal à secagem em estufa a uma temperatura de $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ até que apresentaram-se quebradiças com no máximo 10% de umidade.

Concluída a secagem das folhas, reduziu-se a pequenos fragmentos através da trituração em triturador, para aumentar a superfície de contato entre o material vegetal e os solventes extratores utilizados. Após, foram produzidos os extratos vegetais pelo método de maceração, empregando-se quatro diferentes solventes

com graus de polaridade distintos, sendo eles: hexano, clorofórmio, acetato de etila e etanol. A proporção utilizada de vegetal:solvente foi de 1:10 (p/v).

Em frasco âmbar, adicionou-se o primeiro solvente, o hexano, o qual foi adicionado ao vegetal seco e triturado e deixado em contato durante três dias, sendo que ao decorrer deste tempo foram realizadas agitações periódicas. Passado o tempo de extração, o extrato foi filtrado a vácuo sendo que a parte líquida foi rotaevaporada em banho termostatizado à 40 °C para a remoção do solvente e o vegetal novamente submetido a maceração com outro solvente, o clorofórmio e assim sucessivamente com acetato de etila e etanol. Após a rotaevaporação, os extratos foram armazenados em refrigerador a uma temperatura entre 2 °C - 8 °C até o momento das análises (SIMÕES et al., 2004).

Assim, foram produzidos quatro extratos vegetais para cada planta: extrato hexânico, extrato clorofórmico, extrato de acetato de etila e extrato etanólico.

3.1.3 Determinação do rendimento dos extratos

Após a produção dos extratos vegetais, procedeu-se o cálculo do rendimento em % de cada um deles.

3.1.4 *Screening* dos extratos

A fim de avaliar qualitativamente os extratos quanto aos possíveis constituintes fitoquímicos que apresentam ação antioxidante e otimizar as análises para a avaliação da atividade antioxidante dos mesmos, procedeu-se o ensaio de autobiografia por cromatografia em camada delgada (CCD) conforme metodologia adaptada de Wagner & Bladt 1996.

Para tanto, preparou-se uma solução de trabalho de 10 mg/mL de cada um dos extratos empregando-se solventes adequados para solubilização e a partir desta quatro soluções nas seguintes concentrações: 8 mg/mL; 6 mg/mL; 4 mg/mL e 2

mg/mL. Preparou-se ainda uma solução tida como padrão antioxidante de ácido ascórbico 10 mg/mL e uma solução reveladora de DPPH 0,004%.

Em placas cromatográficas de sílica gel aplicou-se 10 µL de cada um dos extratos nas concentrações acima descritas e em seguida borrifou-se a solução reveladora de DPPH 0,004%. Após a secagem em temperatura ambiente, avaliou-se os resultados conforme Figuras 8 e 9.

Além disso, realizou-se a análise qualitativa da presença de constituintes nos extratos preparados através de cromatografia em camada delgada onde aplicou-se 10 µL dos extratos na concentração da solução de trabalho (10 mg/mL) e otimizou-se o melhor sistema de eluição. Para tanto foram empregados os seguintes solventes: clorofórmio (placa 1), metanol/clorofórmio 1:9 (placa 2), metanol/clorofórmio 2:8 (placa 3) e metanol/clorofórmio 5:5 (placa 4). Após a eluição, borrifou-se solução reveladora de DPPH 0,004% nas placas cromatográficas. Os resultados estão representados na Figura 10.

3.2 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, Cuvelier e Berset (1995).

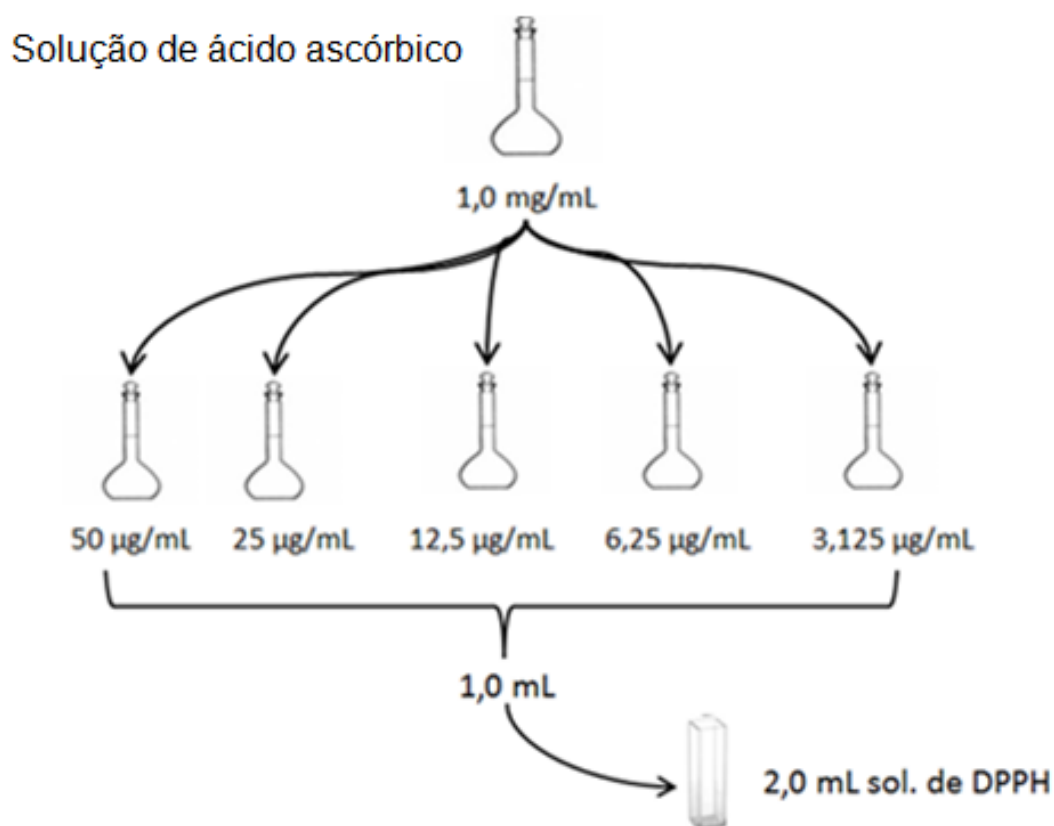
Como padrão antioxidante utilizou-se o ácido ascórbico. Trata-se de um agente antioxidante utilizado comumente para preservar a cor natural e o sabor de muitos alimentos, é classificado como um antioxidante removedor de oxigênio, pois age capturando o oxigênio presente no meio por meio de reações químicas estáveis e pode atuar também como sinergista na regeneração de antioxidantes primários (BELITZ & GROSCH, 1997; RAMALHO & JORGE, 2006).

Primeiramente, no dia da análise, foi preparada uma solução metanólica de DPPH 0,004%. Para tanto, dissolveu-se 0,004 g de DPPH em quantidade suficiente

(qs) de metanol, transferiu-se a solução para um balão volumétrico âmbar de 100 mL e completou-se o volume também com metanol e homogeneizou-se a solução.

Em seguida, foi realizada a curva padrão de ácido ascórbico (padrão controle positivo) onde, partindo-se de uma solução de ácido ascórbico de 1,0 mg/mL foram preparadas concentrações de 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 $\mu\text{g/mL}$ em metanol. As análises foram feitas em triplicata. Para a leitura das absorbâncias das amostras, incubou-se a temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) 2,0 mL da solução de DPPH 0,004% e 1,0 mL das soluções de ácido ascórbico, durante 30 minutos, conforme ilustrado na Figura 5. O tempo para preparar cada solução foi cronometrado (40 segundos) entre cada uma delas para evitar leituras muito heterogêneas. Decorrido o tempo de incubação, foi procedida à leitura das amostras em espectrofotômetro UV-visível a um comprimento de onda de 517 nm.

Figura 5 – Concentrações empregadas para a avaliação da atividade antioxidante



Ainda, foi preparado um branco da amostra e um controle negativo. O branco da amostra foi preparado incubando-se por 30 minutos, 2,0 mL de metanol e 1,0 mL das soluções contendo a amostra (extratos), em seguida foi realizada a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro UV-visível a um comprimento de onda de 517 nm, sendo que o equipamento foi zerado com metanol. O controle negativo foi feito incubando-se durante 30 minutos, 2,0 mL da solução de DPPH 0,004% e 1,0 mL de metanol. Em seguida foi realizada a leitura em espectrofotômetro UV-visível a um comprimento de onda de 517 nm.

A leitura das absorbâncias das amostras (extratos) foi procedida da seguinte maneira: partindo-se de uma solução estoque dos extratos de 1,0 mg/mL foram preparadas soluções nas concentrações de 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,125 µg/mL em metanol. Em ambiente escuro, foi transferida uma alíquota de 1,0 mL de cada concentração dos extratos para tubos falcon com 2,0 mL da solução de DPPH 0,004% e homogeneizados por 1 minuto em agitador de tubos. Após, as amostras foram incubadas por 30 minutos e as absorbâncias lidas em espectrofotômetro UV-visível a um comprimento de onda de 517 nm.

Realizadas as leituras das absorbâncias das amostras, do branco e do controle, foi procedido o cálculo da absorção máxima do radical livre DPPH, conforme apresentado abaixo e ainda para cada extrato foi calculado o IC50:

$$\% \text{ AA} = \frac{100 - (\text{Absorbância da amostra} - \text{absorbância do branco})}{\text{Absorbância do controle}} * 100$$

3.3 Atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos frente à *E. coli* e *L. monocytogenes* foi realizada pelo método de diluição em caldo (microdiluição) conforme metodologia adaptada das normas do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (NCCLS, 2006).

3.3.1 Culturas microbianas

Para a determinação da atividade antimicrobiana foram empregadas linhagens padrão American Type Culture Collection (ATCC) de *E. coli* (ATCC 25922) e de *L. monocytogenes* (ATCC 7644) sendo que os códigos do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) são 00033 e 00266, respectivamente. Os microrganismos foram cedidos pelo Laboratório de Microrganismos de Referência da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ e encontravam-se na forma liofilizada em ampolas.

3.3.2 Diluição dos extratos

Os extratos vegetais obtidos de *E. anomala* e *P. salutare* foram diluídos para proceder à análise da atividade antimicrobiana. Para tanto foi pesado 0,2 g de cada um deles e transferidos para balões volumétricos de 10 mL. Em seguida, em capela de fluxo laminar foram adicionados 8,0 mL de água deionizada estéril e 0,5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Cada extrato foi homogeneizado em banho ultrassônico até completa solubilização e após, o volume do balão volumétrico foi aferido com água deionizada estéril. Assim, foi obtida uma solução de trabalho de 20.000 µg/mL com DMSO a 0,5%.

3.3.3 Padrão antimicrobiano

Como padrão antimicrobiano foi empregado o cloranfenicol 0,2 µg/µL obtido através da diluição de 250 µL de colírio oftálmico contendo cloranfenicol 4 mg/mL em balão volumétrico de 5 mL e aferido o volume com água deionizada estéril e homogeneizou-se.

3.3.4 Controle do diluente

O diluente empregado para melhor solubilização dos extratos foi o dimetilsulfóxido. Para avaliar alguma possível contaminação, preparou-se sob condições assépticas, uma solução controle do diluente, onde em balão volumétrico de 10 mL adicionou-se 0,5 mL de DMSO e aferiu-se o volume com água deionizada estéril e homogeneizou-se.

3.3.5 Ressuspensão dos microrganismos

As linhagens bacterianas liofilizadas de *E. coli* e *L. monocytogenes*, contidas em ampolas, foram reidratadas em condições assépticas ressuspensando-as em 0,3 a 0,5 mL do meio líquido recomendado Brain Heart Infusion (BHI). Após a ressuspensão dos microrganismos, dividiu-se o conteúdo de cada ampola, onde uma das partes foi armazenada em skin milk e mantida em ultra freezer a -80°C e a outra foi semeada em placa contendo o meio adequado para cada microrganismo para ser empregado na preparação dos inóculos.

3.3.6 Preparo e padronização dos inóculos

Procedeu-se o preparo e padronização dos inóculos de cada um dos microrganismos, *E. coli* e *L. monocytogenes*, em momentos distintos e sob condições assépticas em capela de fluxo laminar, conforme descrito a seguir.

A partir da cepa ressuspensa de *E. coli* realizou-se o repique em placas de Petry estéreis contendo meio de cultura Ágar Mueller Hinton (Difco) e incubou-se em estufa bacteriológica a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 18 horas. A cepa ressuspensa de *L. monocytogenes* foi repicada em placas de Petry estéreis contendo meio Oxford suplementado (Difco) e incubadas em estufa bacteriológica a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas.

Transcorrido o tempo de incubação e crescimento dos microrganismos, preparou-se sob condições assépticas os inóculos dos microrganismos. Para tanto, adicionou-se em tubo de ensaio contendo 5,0 mL de solução salina estéril 0,85% uma alçada do microrganismo e em seguida agitou-se em agitador de tubos durante 1 minuto.

Para a padronização dos inóculos preparados, foi realizada a leitura da turbidez, equivalente à escala nefelométrica de McFarland em 0,5, em espectrofotômetro UV-visível em comprimento de onda de 625 nm. As absorbâncias lidas estiveram na faixa de 0,08 – 0,10 indicando assim a presença de uma população de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (unidades formadoras de colônia por mililitro) de *E. coli* e *L. monocytogenes*.

3.3.7 Concentração inibitória mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima dos extratos foi avaliada a partir do método de microdiluição onde foram empregados pequenos volumes de inóculo adicionados a placas de acrílico estéreis contendo 96 poços dispostos em doze colunas (1 – 12) e oito linhas (A – H).

Todas as análises foram realizadas em triplicata e em capela de fluxo laminar. As placas de acrílico estéreis foram divididas de forma que a cada três colunas foi adicionada uma amostra diferente: extrato (6 colunas / 2 extratos diferentes), padrão antimicrobiano (3 colunas) e diluente DMSO (3 colunas).

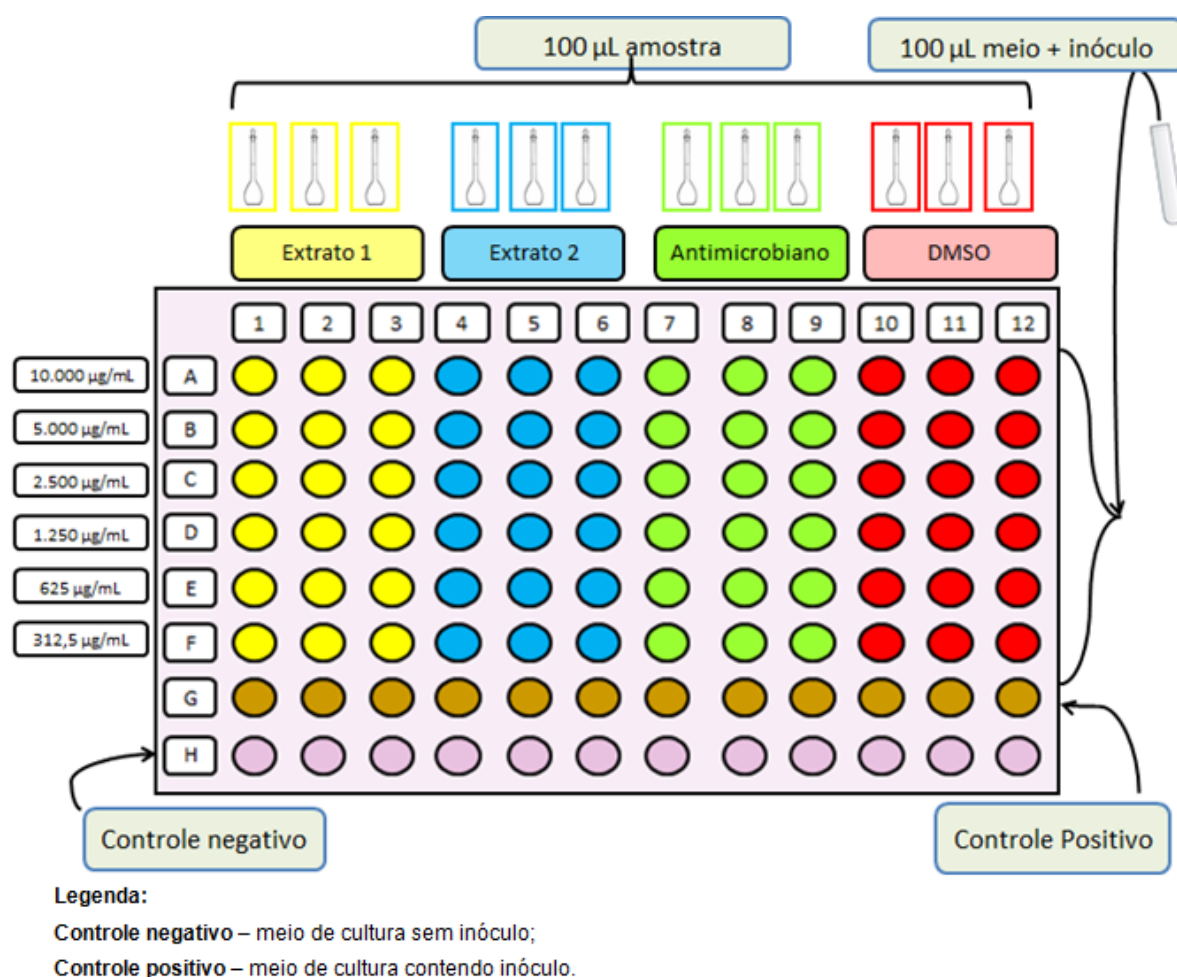
Primeiramente foi preparado o meio de cultura contendo o inóculo, onde adicionou-se 200 µL dos inóculos (*E. coli* e *L. monocytogenes*) padronizados para tubos de ensaio contendo 10 mL de caldo caseína de soja (TSA), sendo que em alguns tubos de ensaio não foram adicionados os inóculos para utilização como controle negativo.

Após, realizou-se a microdiluição nas placas onde nas linhas A até F, em cada um dos 12 poços (correspondente às colunas) foi adicionado 100 µL do meio

contendo o inóculo. Nas linhas G e H, foram preparados os controles, sendo o controle positivo (meio de cultura contendo inóculo) e negativo (meio de cultura sem o inóculo), respectivamente.

Em seguida, na linha A, a cada três colunas foi adicionado 100 μL das amostras, conforme descrito a seguir: colunas 1 até 3 e colunas 4 até 6, dois diferentes extratos; colunas 7 até 9, o padrão de antimicrobiano (cloranfenicol) e 10 até 12 o controle do diluente (DMSO), conforme ilustrado na Figura 6. Assim, todos os poços da linha A continham 200 μL .

Figura 6 – Placa para determinação da concentração inibitória mínima dos extratos



Homogeneizou-se os poços da linha A contendo as amostras conforme descrito anteriormente e transferiu-se 100 μL para os próximos poços (linha B) e assim sucessivamente até os poços da linha F, do qual foi retirado 100 μL que foi transferido para uma segunda placa onde procedeu-se o preparo de outra placa

conforme descrito anteriormente, sendo que nesta os 100 µL de amostra retirado da linha F foi descartado. Assim, foram realizadas 12 diluições de cada amostra.

Ao término das diluições, as placas foram incubadas a 37 ± 1 °C durante 18 horas para a análise da atividade antimicrobiana frente a *E. coli* e 24 horas para a *L. monocytogenes*. Transcorrido o tempo de crescimento, foi verificado visualmente se houve crescimento microbiano nas placas através da presença de turvação a qual indicou crescimento microbiano, enquanto que a visualização de poços límpidos correspondeu ao não crescimento microbiano.

As concentrações obtidas para os extratos de *E. anomala* e *P. salutare* na primeira placa foram: 1º poço: 10.000 µg/mL, 2º poço: 5.000 µg/mL, 3º poço: 2.500 µg/mL, 4º poço: 1.250 µg/mL, 5º poço: 625 µg/mL, 6º poço: 312,5 µg/mL. Na segunda placa as concentrações obtidas foram: 1º poço: 156,2 µg/mL, 2º poço: 78 µg/mL, 3º poço: 39 µg/mL, 4º poço: 19,5 µg/mL, 5º poço: 9,8 µg/mL, 6º poço: 4,9 µg/mL.

Para o padrão antimicrobiano de cloranfenicol, as concentrações finais obtidas na primeira placa foram: 1º poço: 100 µg/mL, 2º poço: 50 µg/mL, 3º poço: 25 µg/mL, 4º poço: 12,5 µg/mL, 5º poço: 6,25 µg/mL, 6º poço: 3,125 µg/mL.

3.3.8 Confirmação da atividade inibitória mínima

Devido ao fato dos extratos apresentarem coloração característica que dificulta a visualização da presença ou ausência de turvação, realizou-se a confirmação do crescimento microbiano nos poços por meio da aplicação de 16 µL de solução aquosa estéril de cloreto de trifeniltetrazólio 0,5% em todos os poços de cada placa.

A formação de coloração vermelha produzida após a adição da solução de TTC 0,5% indica que houve crescimento bacteriano, pois o cloreto de trifeniltetrazólio forma um complexo vermelho com as enzimas de respiração celular dos organismos vivos. Portanto, os poços que desenvolveram coloração vermelha

apresentaram crescimento bacteriano indicando que a concentração do extrato não é eficaz para inibir o crescimento de *E. coli* e *L. monocytogenes*.

3.3.9 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)

A determinação da concentração bactericida mínima dos extratos (CBM) foi realizada através da semeadura em placas de Petry contendo meio Ágar Mueller-Hinton e meio Oxford suplementado para *E. coli* e *L. monocytogenes*, respectivamente, de todos os poços onde os extratos apresentaram-se límpidos (sem formação de coloração vermelha). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 ± 1 °C durante 18 horas e 24 horas para *E. coli* e *L. monocytogenes*, respectivamente.

Transcorrido o tempo de crescimento foi realizada a interpretação dos resultados da seguinte maneira: nas placas onde houve crescimento do microrganismo o extrato possui ação bacteriostática e naquelas onde não houve crescimento microbiano o extrato tem ação bactericida.

3.4 Avaliação da citotoxicidade *in vitro* dos extratos

A avaliação da citotoxicidade *in vitro* dos extratos de *E. anomala* e *P. salutare* foi procedida conforme metodologia adaptada desenvolvida por Springer, Azbill e Carlson (1998).

3.4.1 Cultura da linhagem celular

A linhagem celular empregada para avaliação da citotoxicidade foi de células epiteliais de Ovário de Hamster Chinês (CHO) devido à facilidade de cultivo. Estas células foram cultivadas em frasco para cultura de células contendo meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) + HAM F-10, acrescido de estreptomicina e

penicilina e suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) a 37 °C em incubadora com atmosfera de 5% de CO₂.

Como padrão utilizou-se a doxorubicina que trata-se de um quimioterápico (antineoplásico) pertencente a classe das antraciclinas, derivado do fungo *Streptococcus peucitius* var. *caesius*. É empregado no tratamento de linfomas malignos, tumores sólidos, carcinoma metastático de mama e carcinoma de células epiteliais do pulmão, sarcomas em crianças e adultos (Ewing e osteogênico) e sarcomas de tecido mole (BRUNTON et al., 2012).

3.4.2 Método de repique e viabilidade celular

O repique e a avaliação da viabilidade celular foram realizados pelo método de exclusão por Azul de Trypan. O meio de cultivo contido nos frascos de cultura celular foi desprezado e adicionado 2 mL de uma solução de lavagem de tampão fosfato salina (PBS) e realizados movimentos suaves para a remoção de resíduos de meio de cultura, a solução foi descartada e procedida nova lavagem.

Após, procedeu-se a tripsinização para soltar as células aderidas ao frasco de cultura, para tanto preparou-se uma solução de tripsina onde dilui-se 500 µL de tripsina em 1 mL de solução PBS, homogeneizou-se e transferiu-se 400 µL desta solução para os frascos de cultura contendo as células e incubou-se em incubadora a 37 °C por aproximadamente 1 minuto. Transcorrido o tempo, observou-se em microscópio se as células deixaram de estar aderidas ao frasco de cultura.

Em seguida, adicionou-se aos frascos 2 mL de meio DMEM + HAM F10 suplementado com 10% de soro bovino fetal (SFB) para a inativação da enzima tripsina adicionada anteriormente. Após, verteu-se esta solução para tubos falcon e centrifugou-se em centrífuga refrigerada a 10 °C numa rotação de 2.000 rpm por 10 minutos. Realizada a centrifugação, desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet em 1 mL de meio DMEM + HAM F10, homogeneizou-se e completou-se o volume para 5 mL e procedeu-se nova centrifugação sob as mesmas condições realizadas anteriormente.

Após a centrifugação, removeu-se o meio do tubo falcon e adicionou-se 1 mL do meio DMEM + HAM F10 para homogeneização do pellet contido no tubo. Em seguida, preparou-se uma solução de corante de azul de Trypan, onde em eppendorf de 1 mL pipetou-se 90 µL de azul de Trypan e 10 µL de meio DMEM + células, homogeneizou-se e pipetou-se 10 µL do corante em câmara de Neubauer, onde realizou-se a contagem das células viáveis (não coraram de azul).

3.4.3 Avaliação da citotoxicidade *in vitro* pelo método de Alamar Blue

Primeiramente, preparou-se uma solução contendo meio Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM + HAM F10), suplementado com 10% de SBF e as células, para o plaqueamento de 200 µL de solução contendo células a uma densidade de 2×10^4 células/poço. Incubou-se durante 4 horas em incubadora com atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C. Transcorrido o tempo, desprezou-se o meio contido nas placas e as células foram lavadas com 200 µL de solução de PBS, em seguida, procedeu-se o tratamento das células adicionando-se 200 µL de solução dos extratos 100 µg/mL, do padrão doxorrubicina (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).

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

Calculou-se a morte celular das amostras, sendo que com os extratos que apresentaram maior grau de morte celular (próximo a 75%) procedeu-se a avaliação da citotoxicidade em três concentrações, sendo elas 100, 50 e 25 µg/mL e calculou-se o IC₅₀ dos mesmos.

3.5 Análise estatística

Para a análise estatística da atividade antioxidante empregou-se a média de três repetições $\pm$ Standard Error of the Mean (SEM) e após aplicou-se ANOVA seguida de comparações múltiplas pelo teste de Tukey. Foram considerados estatisticamente diferentes os resultados que apresentaram probabilidade de ocorrência da hipótese de nulidade menor que 1% ($p < 0,01$). Utilizou-se o programa BioEstat 5.0 e Excel 2010.

Na citotoxicidade *in vitro*, utilizou-se a média de três repetições $\pm$ desvio padrão. Aplicou-se ANOVA um critério.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Material vegetal

4.1.1 Rendimentos

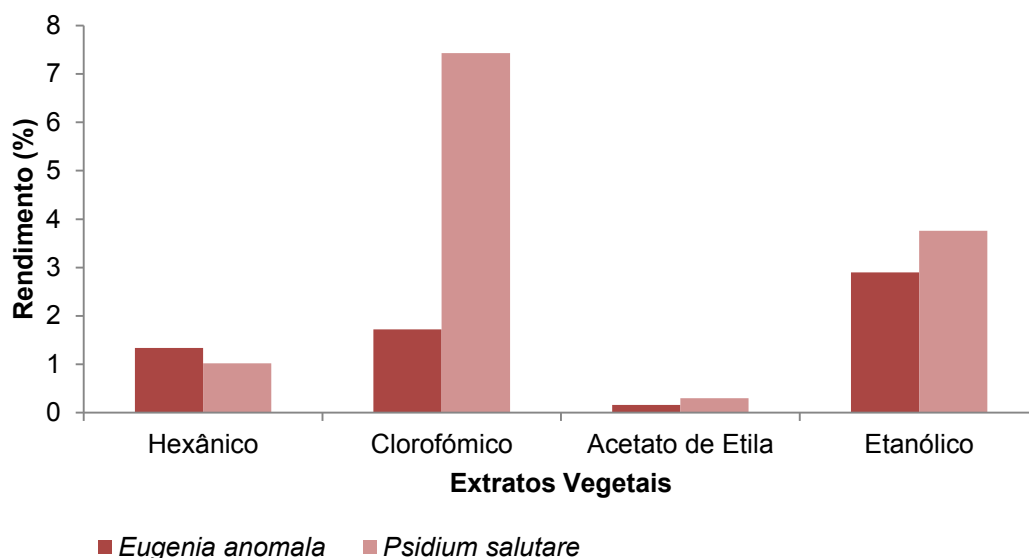
Após procedido o preparo dos extratos e eliminado totalmente os solventes, calculou-se os rendimentos para cada material vegetal, conforme a Tabela 1.

Tabela 1 – Rendimentos (%) dos extratos utilizados no estudo

Extratos	Rendimentos (%)	
	<i>E. anomala</i>	<i>P. salutare</i>
Hexânico	1,34	1,02
Clorofórmio	1,72	7,43
Acetato de etila	0,16	0,30
Etanólico	2,90	3,76
Total	6,12	12,51

Pode-se observar que o rendimento foi maior nos extratos etanólico e clorofórmico, sendo que no caso da *E. anomala* o rendimento foi superior no extrato etanólico (2,90%) e clorofórmico (1,72%), e da *P. salutare* o extrato clorofórmico (7,43%) seguido pelo etanólico (3,76%), conforme representado na Figura 7. Ainda, pode-se observar que a espécie *P. salutare* teve rendimento total maior (12,51%) quando comparada a *E. anomala* (6,12%).

Figura 7 – Comparativo do rendimento (%) dos extratos vegetais de *E. anomala* e *P. salutare*



Fiuza e colaboradores (2008) após o preparo de extrato bruto etanólico a partir do pó das folhas de *E. uniflora* obtiveram um rendimento de 25,78%, sendo que as frações obtidas a partir do extrato bruto apresentaram os seguintes rendimentos: 13,8% para a fração hexano; 11,7% para a fração clorofórmio e 9% para a fração acetato de etila. No estudo de Alves e colaboradores (2011) o rendimento obtido a partir de extrato hidroalcoólico de folhas de *E. dysenterica* foi de cerca de 15%.

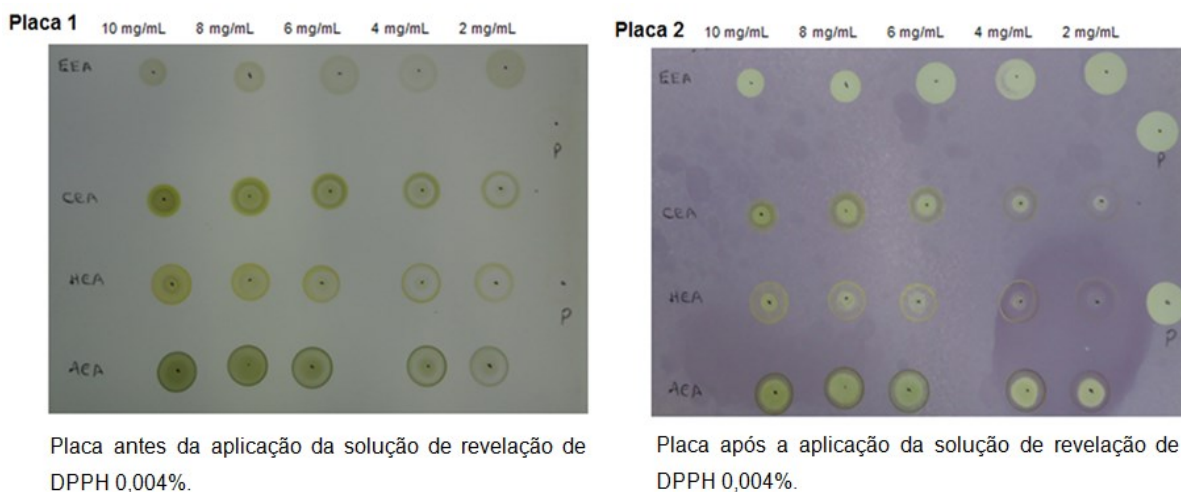
No estudo de Garmus e colaboradores (2014) foi avaliado o rendimento de extratos de *Eugenia uniflora* L. obtidos inicialmente por extração em leito supercrítico CO₂ (apolar), após com etanol/água (5:2) e água. Os resultados demonstraram que o rendimento da extração aumentou com a polaridade do solvente

4.1.2 Screening dos extratos

Realizada a autobiografia por CCD dos extratos de *E. anomala* (EEA – etanólico, CEA - clorofórmico, HEA - hexânico e AEA – acetato de etila) e *P. salutare* (EPS - etanólico, CPS – clorofórmico, HPS - hexânico e APS – acetato de etila) em

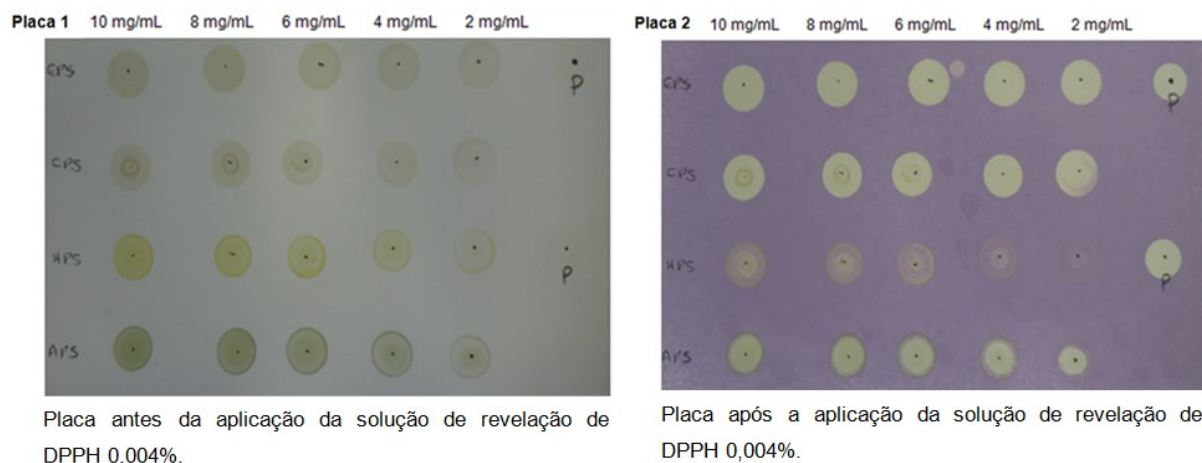
diferentes concentrações e do padrão antioxidante de ácido ascórbico (P), obteve-se os resultados apresentados nas Figuras 8 e 9 que mostram as imagens obtidas antes (Placa 1) e após (Placa 2) a aplicação da solução de revelação de DPPH 0,004%.

Figura 8 - Autobiografia dos extratos de *E.anomala*



Pode-se observar que após a aplicação da solução de revelação de DPPH 0,004% os extratos etanólico (EEA) e de acetato de etila (AEA) apresentaram maior potencial de redução do radical DPPH, pois em todas as concentrações formou coloração clara (amarelada) mais acentuada, entretanto os extratos clorofórmico (CEA) e hexânico (HEA) também apresentaram este potencial, porém de menor relevância observada pela diminuição na intensidade da coloração amarela conforme a diminuição da concentração dos extratos.

Figura 9 - Autobiografia dos extratos de *P. salutare*

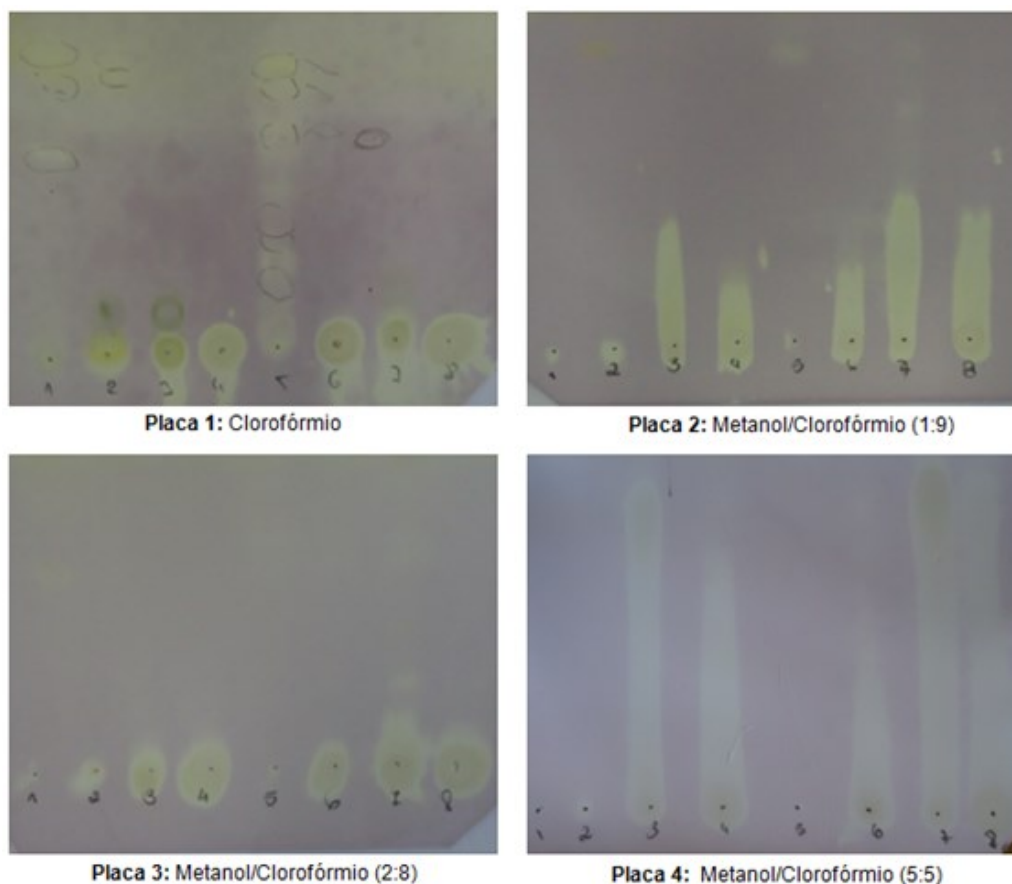


Todos os extratos de *P. salutare* também apresentaram potencial de ação antioxidante, sendo que os extratos etanólico (EPS), clorofórmico (CPS) e de acetato de etila (AEP) demonstraram maior relevância em todas as concentrações testadas, próximo ao padrão de ácido ascórbico. Entretanto, o extrato hexânico (HPS) apresentou potencial antioxidante que diminuiu conforme a redução na concentração aplicada, sendo que na concentração 2 mg/mL não apresentou tal potencial.

Assim, os extratos de *E. anomala* e *P. salutare* testados demonstraram potencial de ação antioxidante devido à redução promovida no radical livre DPPH, observada através da coloração clara (amarelada) formada nos pontos de aplicação dos mesmos após o borrifamento da solução reveladora de DPPH 0,004% (YADAV et al., 2011).

Após a realização da CCD com a aplicação dos extratos de *E. anomala* e *P. salutare* (10 mg/mL) em placas de sílica gel com quatro condições diferentes de eluição e posterior aplicação de solução reveladora de DPPH 0,004%, obteve-se os resultados representados na Figura 10.

Figura 10 - CCD dos extratos de *E. anomala* e *P. salutare* empregando-se diferentes graus de eluição



Legenda: Extratos de *E. anomala* (1-hexânico; 2- clorofórmico; 3-acetato de etila; 4-etanólico), extratos de *P. salutare* (5-hexânico; 6-clorofórmico; 7-acetato de etila; 8-etanólico).

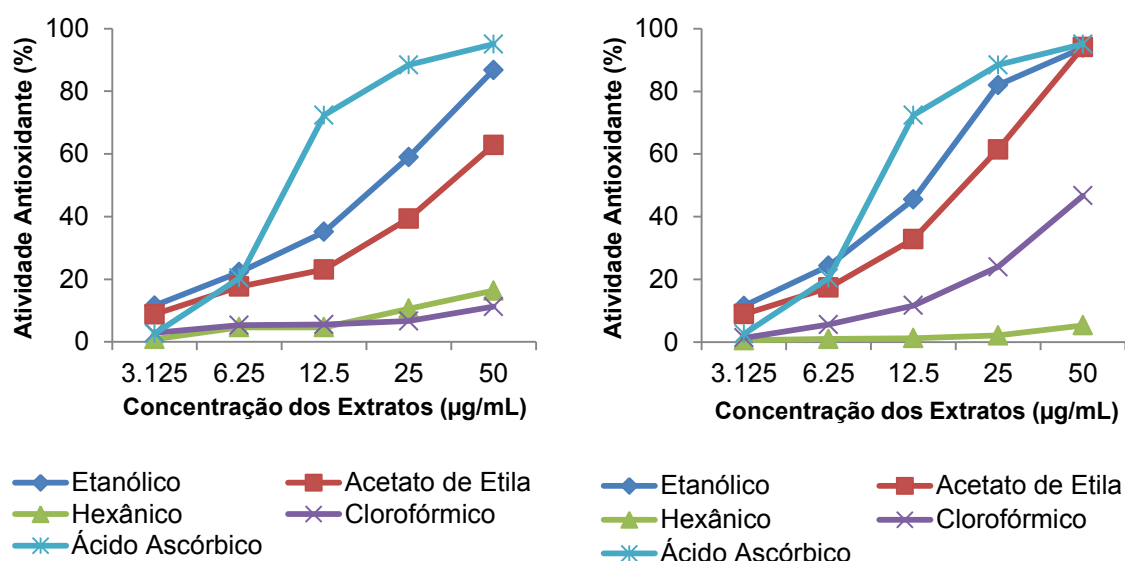
Pode-se perceber que os extratos de *E. anomala* e *P. salutare* apresentam em sua constituição algumas substâncias com polaridade reduzida (Placa 1, 2 e 3) e diversas substâncias com maior polaridade (Placa 4) que possuem potencial antioxidante percebida pela coloração amarelada após a aplicação de solução reveladora de DPPH 0,004%, sendo que o extrato hexânico de ambas espécies vegetais demonstrou mínimo potencial antioxidante. Entretanto, não é possível identificar quais as substâncias presentes que conferem tal potencial aos extratos, sendo necessária a realização de mais testes empregando-se padrões de substâncias com potencial antioxidante conhecido para determinar a presença e influência na ação.

4.1.3 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, Cuvelier e Berset (1995), a qual baseia-se na redução do radical livre DPPH a difenil-picril-hidrazina 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.

A partir das absorbâncias obtidas após a leitura em espectrofotômetro UV-visível a 517 nm, calculou-se o percentual de atividade antioxidante dos extratos de *E. anomala* e *P. salutare* e do padrão de ácido ascórbico. Obteve-se os resultados conforme representado nas Figuras 11 e 12.

Figura 11 e 12 - Atividade antioxidante dos extratos de *E. anomala* e *P. salutare* em comparação ao padrão ácido ascórbico, respectivamente



Analisando os gráficos pode-se perceber que a atividade antioxidante 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. 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 a espécie vegetal de *P. salutare* também na concentração de 50 µg/mL, 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) apresentou atividade antioxidante 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 2 apresenta os valores de IC50 dos extratos de ambas as espécies vegetais e do padrão de ácido ascórbico, com seus respectivos valores de SEM.

Tabela 2 - Atividade antioxidante (IC50) dos extratos de *E. anomala* e *P. salutare* e respectivo SEM

Extratos	IC 50 (µg/mL)	
	<i>E. anomala</i>	<i>P. salutare</i>
Hexânico	NA	NA
Clorofórmio	NA	NA
Acetato de etila	34,22 ± 0,22	18,96 ± 0,15
Etanólico	19,26 ± 0,11	13,63 ± 0,30

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, sendo ele 19,26 ± 0,11 e 13,63 ± 0,30, respectivamente. O extrato etanólico de *P. salutare* foi o extrato que apresentou o IC50 mais próximo ao do padrão de ácido ascórbico IC50 de 9,27 ± 0,04, 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 demonstraram atividade antioxidante em extratos de plantas da família Myrtaceae e das espécies de *Eugenia* e *Psidium*, conforme apresentado a seguir.

O estudo de Reynerston, Basile e Kennelly (2005) avaliou a atividade antioxidante de extratos de plantas das espécies *Eugenia aggregata*, *Eugenia foetida*, *Eugenia stipitata*, *Eugenia uniflora*, *M. cauliflora* e *S. samarangense*. Os resultados obtidos mostraram que *M. cauliflora* possui a melhor ação antioxidante em 35 µg/mL, *E. aggregata*, *E. stipitata*, *S. samarangense* foram moderadamente ativos com valores de IC50 em 74,1 µg/mL, 79,0 µg/mL e 76,8 µg/mL, respectivamente. O padrão de ácido ascórbico teve IC50 de 18,3 µg/mL.

O estudo de Kanoun e colaboradores (2014) examinou a atividade antioxidante *in vitro* utilizando DPPH, o teor de fenóis totais, de flavonoides e taninos condensados de extratos brutos e fração de acetato de etila, butanol de *Myrtus communis* L. (Myrtaceae). Os resultados demonstraram que o extrato de acetato de etila seguido pelo extrato obtido da fração butanólica das folhas e bagas possuem maior ação antioxidante relacionada à presença de ácido gálico em todas as partes da planta, catequina nas folhas e quercetina na baga (CCD).

Noutro estudo avaliou-se a atividade antioxidante através dos métodos de redução do ferro (III) a ferro íons (II) e eliminação de radicais DPPH de extratos fracionados de *Myrcia splendens* e *Myrcia palustres* (Myrtaceae), com solventes de polaridade crescente (n-hexano, acetato de etila, butanol e água). Os resultados obtidos mostraram que a fração de acetato de etila e butanol apresentaram maior atividade antioxidante em ambas as espécies, onde os valores de IC50 foram de 8,44 e 9,35 µg/mL para *M. splendens* e de 17,83 e 15,34 µg/mL para *M. palustres*, respectivamente, nestes extratos foi encontrada a maior concentração de flavonoides e compostos fenólicos, sendo que a atividade antioxidante está relacionada à presença dos flavonoides (ex. miricitrina) nos extratos destas frações (MORESCO et al., 2014).

O estudo de Settharaksa e colaboradores (2014) avaliou a atividade antioxidante, o conteúdo de flavonoides e compostos fenólicos de extratos fracionados (etanol, metanol e água) de *Syringium gratum* (Myrtaceae) através do método do DPPH e férrico. Os resultados de IC50 foram de 6,77; 23,25 e 50,33 µg/mL para a fração de etanol, metanol e água, respectivamente, sendo que o teor de flavonoides e compostos fenólicos foi maior na fração aquosa.

No estudo de Carvalho Jr. e colaboradores (2014) foi avaliada a composição química e a atividade antioxidante de extratos de folhas e galhos de *Eugenia copacabanensis* Kiaersk (Myrtaceae) e os resultados demonstraram que os extratos apresentam atividade antioxidante promissora, sendo que os valores de IC50 variam de $0,92 \pm 0,04$ a $40,66 \pm 0,59$ $\mu\text{g/mL}$, onde o extrato metanólico dos galhos apresentou maior atividade antioxidante ($\text{IC}_{50} = 0,92 \pm 0,04$ $\mu\text{g/mL}$).

John e colaboradores (2014) investigaram a atividade antioxidante de extratos etanólico, metanólico e aquoso de folhas de *Eugenia singampattiana*. Os resultados obtidos mostraram que o teor de flavonoides e o potencial antioxidante foi maior no extrato metanólico.

No estudo de Thakur & Arya (2014) foi avaliado o perfil fitoquímico de extratos de folhas de *Psidium guajava* L. e demonstrou que esta espécie vegetal é constituída por flavonoides, taninos, saponinas, esteróis, hidratos de carbono e alcalóides. E o trabalho de Braga e colaboradores (2014) quantificou o teor de fenólicos, flavonoides, atividade antimicrobiana, antioxidante e antitumoral de extratos desta mesma espécie sendo que os resultados demonstraram elevado teor de compostos fenólicos, flavonoides e ação antioxidante (87,65%) e a CIM foi de 250 $\mu\text{L/mL}$ contra *S. mutans*, *S. mitis* e *S. oralis*. Assim, o extrato apresenta atividade promissora para o uso tópico na cavidade bucal, para o desenvolvimento de produtos antitumorais ou para ser empregado como alimento funcional.

Fernandes e colaboradores (2014) avaliaram a atividade antioxidante e propriedades físico-químicas de extratos secos por aspersão de folhas de *Psidium guajava* L. e os resultados demonstraram que os extratos apresentam atividade antioxidante significativa e o IC50 encontrado variou de 7,98 – 8,11 $\mu\text{g/mL}$ e não mostrou ação citotóxica as células testadas.

O estudo de Seo e colaboradores (2014) investigou a presença de compostos fenólicos e flavonoides e a ação antioxidante de extratos aquoso, metanólico e etanólico de folhas de *Psidium guajava* L. e os resultados demonstraram que a atividade antioxidante dos extratos está relacionada com o conteúdo de compostos fenólicos que foi maior no extrato etanólico.

Moreno e colaboradores (2014) avaliaram os compostos fitoquímicos e a atividade antioxidante de frutos frescos e farinha obtida dos frutos de *Psidium guajava* L. Os resultados demonstraram que os fitoquímicos dominantes foram o ácido ascórbico e os carotenoides, tanto nos frutos quanto na farinha, também apresentaram potencial antioxidante que pode ser explicado pela presença dos compostos fenólicos, flavonoides, carotenoides e vitamina C. No estudo de Castro e colaboradores (2014) foi investigada a ação antifúngica e antioxidante e a citotoxicidade do óleo essencial de *Psidium cattleianum* e os resultados demonstraram que o extrato apresenta ação antioxidante e antifúngica.

No estudo de Wildner (2014) no qual foi avaliada a ação antioxidante de extratos brutos aquosos e etanólico de *E. anomala*, *E. arenosa*, *E. pitanga* e *P. salutare*, observou-se que todos os extratos são muito ativos, onde o extrato bruto etanólico de *E. arenosa* apresentou IC₅₀ (10,94 µg/mL) semelhante estatisticamente ao padrão de ácido ascórbico. Assim, todos os extratos apresentaram grande potencial de aplicação em produtos alimentícios e farmacêuticos substituindo antioxidantes sintéticos.

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 o 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, 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 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 (REYNERSTON et al., 2005).

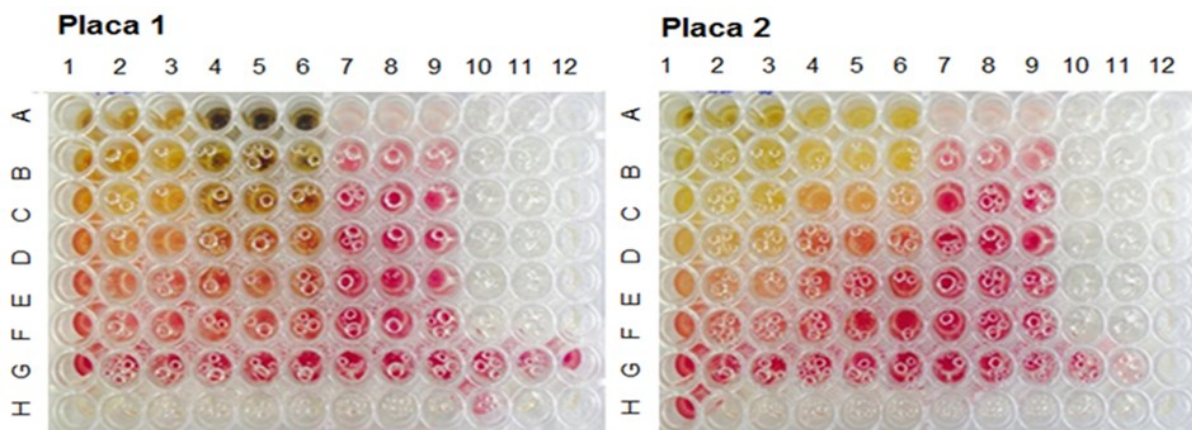
Assim, os extratos de acetato de etila e etanólico de ambas as espécies vegetais estudadas apresentam ação antioxidante muito alta, sendo que os extratos clorofórmico e hexânico não apresentam atividade antioxidante (inativos).

4.1.4 Atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos de *E. anomala* e *P. salutare* 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.

As Figuras 13, 14, 15 e 16 ilustram as imagens obtidas na avaliação da concentração inibitória mínima, após a adição da solução de TTC 0,5%, realizada em placas de 96 poços com sucessivas diluições e controles (G e H), conforme descrito na metodologia.

Figura 13 - Concentração inibitória mínima dos extratos de *E. anomala* contra *E. coli*



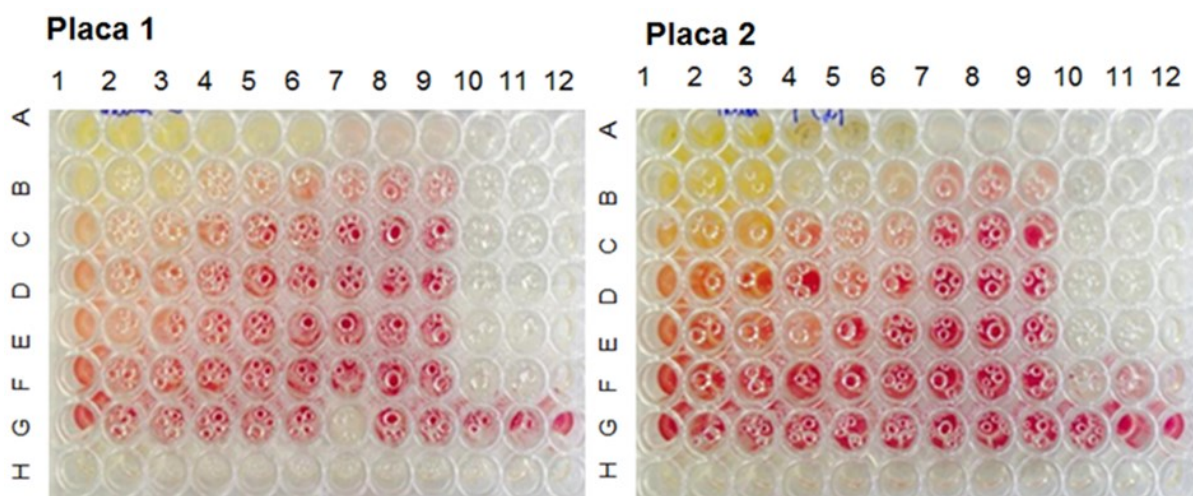
Legenda:

Placa 1 – 1,2,3: extrato de acetato de etila; 4,5,6: extrato clorofórmico; 7,8,9: DMSO; 10,11,12: cloranfenicol;

Placa 2 - 1,2,3: extrato etanólico; 4,5,6: extrato hexânico; 7,8,9: DMSO; 10,11,12: cloranfenicol;

Linhas – A: 10.000 µg/mL; B: 5.000 µg/mL; C: 2.500 µg/mL; D: 1.250 µg/mL; E: 625 µg/mL; F: 312,5 µg/mL; G: controle positivo; H: controle negativo.

Figura 14 - Concentração inibitória mínima dos extratos de *P. salutare* contra *E. coli*



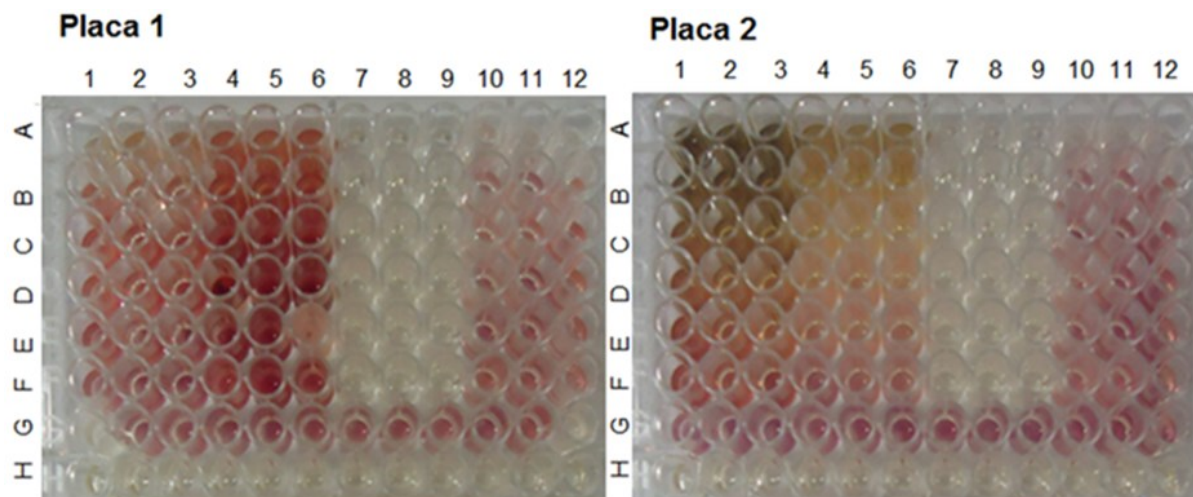
Legenda:

Placa 1 – 1,2,3: extrato de acetato de etila; 4,5,6: extrato clorofórmico; 7,8,9: DMSO; 10,11,12: cloranfenicol;

Placa 2 – 1,2,3: extrato etanólico; 4,5,6: extrato hexânico; 7,8,9: DMSO; 10,11,12: cloranfenicol;

Linhas – A: 10.000 µg/mL; B: 5.000 µg/mL; C: 2.500 µg/mL; D: 1.250 µg/mL; E: 625 µg/mL; F: 312,5 µg/mL; G: controle positivo; H: controle negativo.

Figura 15 - Concentração inibitória mínima dos extratos de *E. anomala* contra *L. monocytogenes*



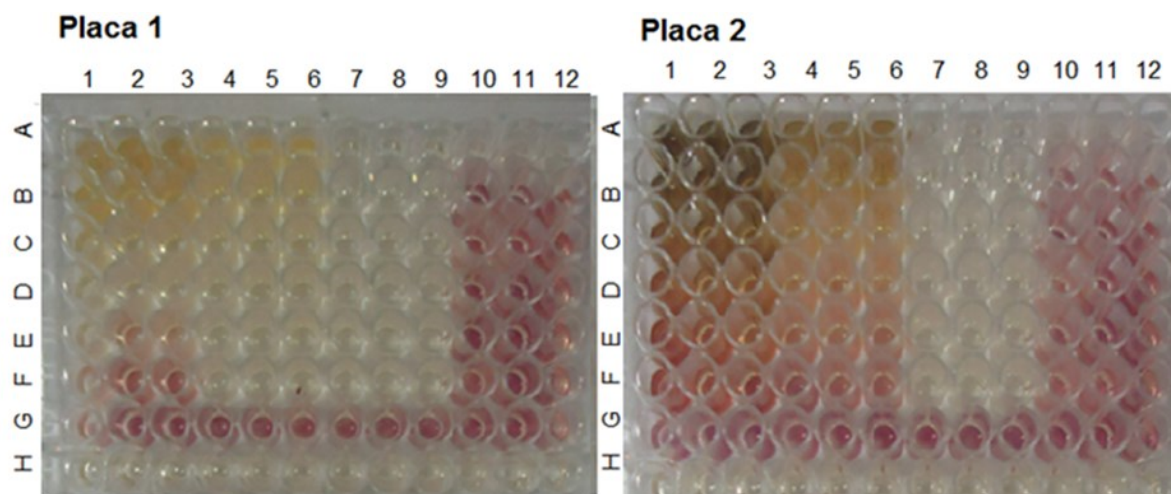
Legenda:

Placa 1 – 1,2,3: extrato etanólico; 4,5,6: extrato clorofórmico; 7,8,9: cloranfenicol; 10,11,12: DMSO;

Placa 2 – 1,2,3: extrato de acetato de etila; 4,5,6: extrato hexânico; 7,8,9: cloranfenicol; 10,11,12: DMSO;

Linhas – A: 10.000 µg/mL; B: 5.000 µg/mL; C: 2.500 µg/mL; D: 1.250 µg/mL; E: 625 µg/mL; F: 312,5 µg/mL; G: controle positivo; H: controle negativo.

Figura 16 - Concentração inibitória mínima dos extratos *P. salutare* contra *L. monocytogenes*



Legenda:

Placa 1 – 1,2,3: extrato etanólico; 4,5,6: extrato clorofórmico; 7,8,9: cloranfenicol; 10,11,12: DMSO;

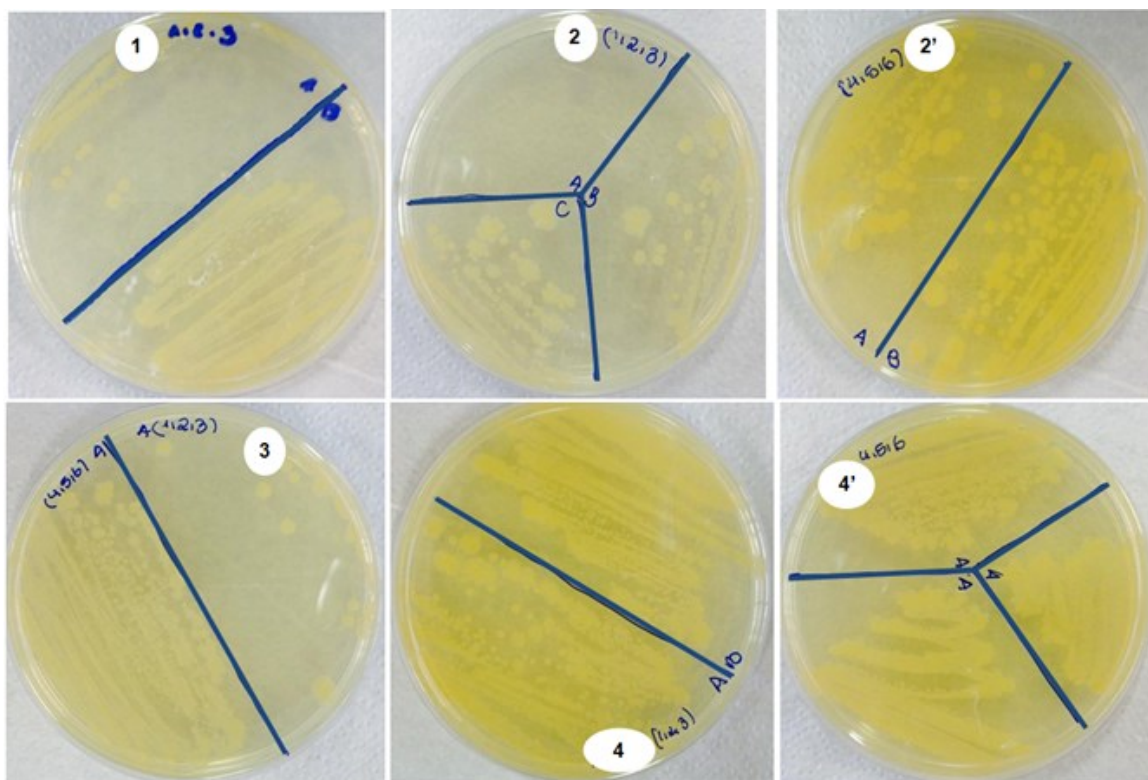
Placa 2 - 1,2,3: extrato de acetato de etila; 4,5,6: extrato hexânico; 7,8,9: cloranfenicol; 10,11,12: DMSO;

Linhas – A: 10.000 µg/mL; B: 5.000 µg/mL; C: 2.500 µg/mL; D: 1.250 µg/mL; E: 625 µg/mL; F: 312,5 µg/mL; G: controle positivo; H: controle negativo.

Pode-se observar que ao adicionar a solução de TTC 0,5% diversos poços apresentaram coloração vermelha (rosada) 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).

As Figuras 17, 18 e 19 ilustram o plaqueamento dos extratos que não apresentaram coloração vermelha após a adição da solução de TTC 0,5% empregada para a confirmação da concentração bactericida mínima.

Figura 17 - Concentração bactericida mínima dos extratos de *E. anomala* e *P. salutare* frente a *E. coli*

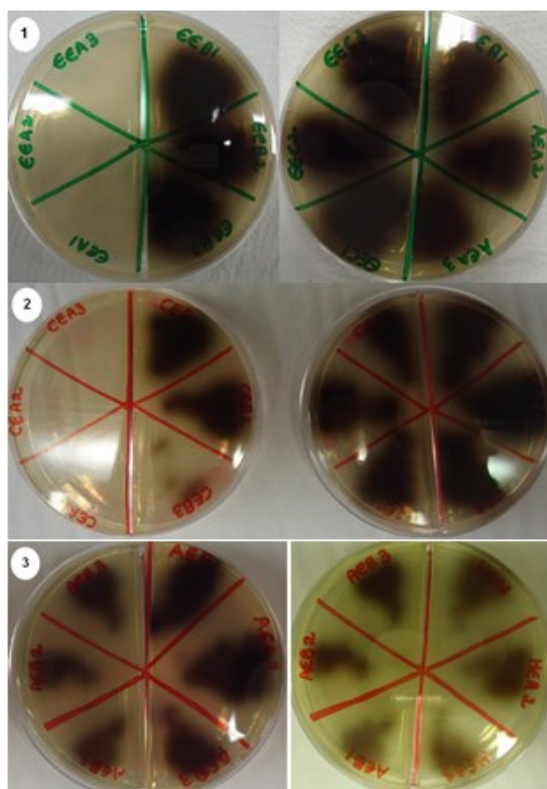


Legenda:

Eugenia anomala: 1- Acetato de Etila; 2 – Etanólico; 2' – Hexânico.

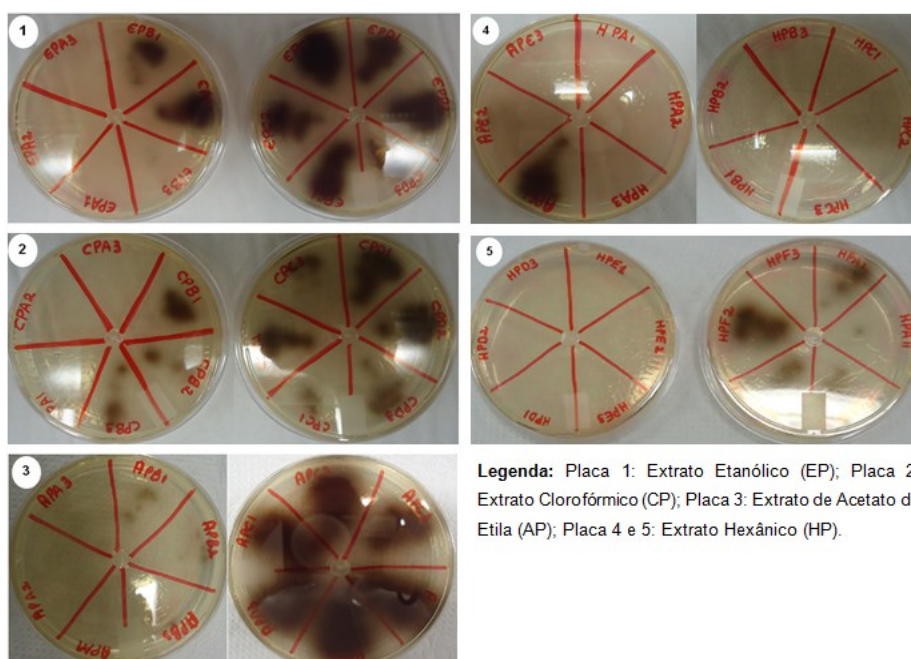
Psidium salutare: 3 – Acetato de etila e Clorofórmico; 4 – Etanólico; 4' – Hexânico.

Figura 18 - Concentração bactericida mínima dos extratos de *E. anomala* frente a *L. monocytogenes*



Legenda: Placa 1: Extrato Etanólico (EE); Placa 2: Extrato Cloro fórmico (CE); Placa 3: Extrato de Acetato de Etila (AE) e Hexânico (HEA).

Figura 19 - Concentração bactericida mínima dos extratos de *P. salutare* frente a *L. monocytogenes*



Legenda: Placa 1: Extrato Etanólico (EP); Placa 2: Extrato Cloro fórmico (CP); Placa 3: Extrato de Acetato de Etila (AP); Placa 4 e 5: Extrato Hexânico (HP).

Pode-se observar que houve crescimento bacteriano, tanto da *E. coli* quanto da *L. monocytogenes*, na maior parte das placas indicando assim que os extratos avaliados não possuem ação bactericida (morte dos microrganismos) somente bacteriostática.

Os resultados obtidos da concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima dos extratos de *E. anomala* e *P. salutare* frente a *E. coli* estão demonstrados na Tabela 3.

Tabela 3 - Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima 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	-	< 6,25	< 6,25
Clorofórmico	-	-	10.000	-	< 6,25	< 6,25
Acetato de Etila	5.000	-	10.000	-	< 6,25	< 6,25
Etanólico	2.500	10.000	5.000	-	< 6,25	< 6,25

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 *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 concentração inibitória mínima de 5.000 µg/mL, enquanto 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*.

Os resultados obtidos da concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima dos extratos de *E. anomala* e *P. salutare* contra *L. monocytogenes* estão demonstrados na Tabela 4.

Tabela 4 - Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima dos extratos de *E. anomala* e *P. salutare* frente à *L. monocytogenes*

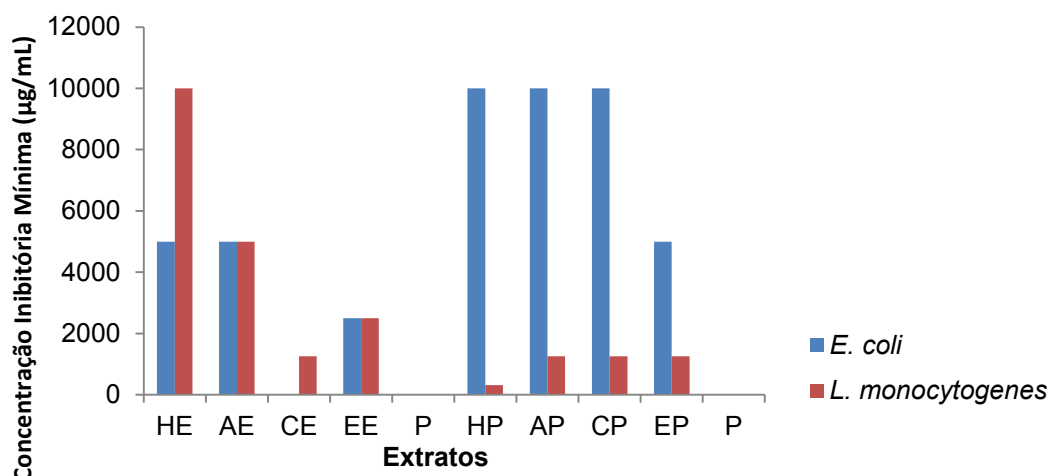
Extratos (µg/mL)	<i>E. anomala</i>		<i>P. salutare</i>		Padrão	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
Hexânico	10.000	-	312,5	625	< 12,5	< 12,5
Clorofórmico	1.250	10.000	1.250	10.000	< 12,5	< 12,5
Acetato de Etila	5.000	-	1.250	10.000	< 12,5	< 12,5
Etanólico	2.500	10.000	1.250	10.000	< 12,5	< 12,5

Pode-se observar que os extratos de ambas as espécies vegetais apresentaram ação bacteriostática contra *L. monocytogenes*. Os extratos de *E. anomala* apresentaram atividade antimicrobiana 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 da espécie 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).

A Figura 20 representa a comparação da concentração inibitória mínima dos extratos estudados frente aos patógenos *E. coli* e *L. monocytogenes*.

Figura 20 - Comparação da CIM dos extratos de *E. anomala* e *P. salutare* frente a *E. coli* e *L. monocytogenes*



HE: hexânico de *E. anomala*; **AE:** acetato de etila de *E. anomala*; **CE:** clorofórmico de *E. anomala*; **EE:** etanólico de *E. anomala*; **HP:** hexânico de *P. salutare*; **AP:** acetato de etila de *P. salutare*; **CP:** clorofórmico de *P. salutare*; **EP:** etanólico de *P. salutare*; **P:** padrão de cloranfenicol.

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 *L. monocytogenes*.

Na literatura ainda não há um consenso que define a atividade antimicrobiana de extratos obtidos de plantas, entretanto diversos estudos classificam tal ação a partir da CIM necessária para inibir patógenos conforme descrito a seguir. 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 apresentam CIM superior a 1.000 µg/mL são inativos frente aos patógenos (RIOS et al., 1988; 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 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.

Diversos estudos já foram realizados avaliando a atividade antimicrobiana de extratos de plantas e óleos essenciais de diferentes famílias contra *E. coli* e *L. monocytogenes*. O estudo de Seyyednejad e colaboradores (2014) avaliou a ação antimicrobiana de extrato bruto etanólico e metanólico de *Cassia fistula* (Fabaceae) contra três microrganismos Gram-positivos (*B. cereus*, *S. aureus* e *S. epidermidis*) e cinco Gram-negativos (*S. typhi*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *P. mirabilis*). Os resultados mostraram que o extrato analisado foi eficaz contra *B. cereus*, *S. aureus*, *S. epidermidis* e *E. coli* (CIM = 5 mg/mL e CBM = 40 mg/mL) e *K. pneumoniae*, sendo que *E. coli* e *B. cereus* foram mais sensíveis ao extrato etanólico e *K. pneumoniae* e *S. aureus* ao extrato metanólico.

No estudo de Aligiannis e colaboradores (2001) foram avaliados óleos essenciais da espécie *Origanum* (Lamiaceae) contra duas bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *S. epidermidis*) e quatro Gram-negativas (*E. coli*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*). Os resultados mostraram que o óleo de *O. scabrum* (contém aproximadamente 74,86% de carvacrol) apresentou atividade antimicrobiana extremamente forte contra todas as bactérias testadas onde o CIM variou entre 0,28 – 1,27 mg/mL.

O estudo realizado por Delgado-Adaméz e colaboradores (2012) avaliou a atividade antimicrobiana de seis extratos brutos de *Prunus salicina* (Rosaceae) obtidos pela extração com água e emprego de Soxhlet. Os resultados demonstraram que todos os extratos exibiram ação antimicrobiana contra *L. innocua* (Gram-positiva) e *E. coli* (Gram-negativa) podendo tal ação estar relacionada a quantidade de compostos fenólicos e ao sinergismo entre os constituintes bioativos.

Kumar e colaboradores (2010) avaliaram a atividade antimicrobiana de extrato bruto aquoso de folhas de *Calotropis gigantea* (Apocynaceae) contra *S. aureus*, *E. coli*, *B. cereus*, *P. aeruginosa*, *M. luteus* e *K. pneumoniae*. Os resultados demonstraram que os extratos apresentam grande ação antimicrobiana sendo que a zona máxima de inibição foi contra *E. coli* ($17,6 \pm 1,55$) onde o CIM foi de 12,5 mg/mL. Tal atividade pode estar relacionada aos compostos bioativos presentes no extrato bruto, podendo ser explorado o isolamento destes compostos.

Arias e colaboradores (2004) avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos de folhas, flores e caule de *Acacia aroma* (Fabaceae) contra bactérias Gram-positivas (*E. faecalis*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. aureus*, *E. faecalis*) e Gram-negativas (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *E. cloacae*, *S. marcescens*, *M. morganii*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*). Os resultados obtidos demonstraram que todos os extratos etanólicos apresentaram atividade antimicrobiana contra Gram-positivas e somente os extratos de folhas e flores mostraram ação contra Gram-negativas, sendo que contra *E. coli* a CIM e a CBM para o extrato de folhas foi 250 µg/mL e o extrato de flores a CIM = 250 µg/mL e a CBM = 1.000 µg/mL. A ação antimicrobiana pode estar relacionada à presença de flavonoides identificados por bioautografia.

No estudo de Santos e colaboradores (2012) foi analisado o óleo essencial das folhas de *Piper malacophyllum* (Piperaceae) contra *S. aureus*, *B. cereus*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* e *E. coli*. Os resultados obtidos mostraram que o óleo essencial apresenta fraca ação antimicrobiana frente a todos os microrganismos, sendo que a CIM para *E. coli* e *B. cereus* foi a menor encontrada dentre os microrganismos de 1.850 µg/mL.

O estudo de Tchana e colaboradores (2014) avaliou a atividade antimicrobiana de *Entada abyssinica* (Fabaceae), *Entada africana* (Fabaceae), *Pentaclethra macrophylla* (Mimosaceae), *Allexis cauliflora* (Violaceae), *Anthocleista leibrechtsiana* (Gentianaceae), *Carapa procera* (Meliaceae), *Carica papaya* (Caricaceae) e *Persea americana* (Lauraceae) contra bactérias Gram-negativas que expressam fenótipos multirresistentes (*E. coli*, *E. aerogenes*, *K. pneumoniae* e *P. stuartii*). Os resultados apresentaram atividade antimicrobiana em CIM entre 64 –

1.024 µg/mL, sendo que o extrato bruto de *Entada africana* apresentou a menor CIM de 64 µg/mL contra *E. coli* enquanto que a melhor CBM foi 256 µg/mL obtido com o extrato metanólico de *Persea americana* também contra *E. coli*.

O estudo de Camargo & Suffredini (2014) avaliou a atividade antimicrobiana de extratos aquosos e orgânicos obtidos de diferentes plantas da Amazônia brasileira contra *E. coli*. Os resultados obtidos mostraram que o extrato orgânico de *Microplumeria* sp. (Apocynaceae), tem a CIM e CBM ≥ 700 mg/mL; o extrato aquoso de *Casearia* sp. (Salicaceae) tem CIM=CBM=600 mg/mL; o extrato orgânico de *Buchenavia* sp. (Combretaceae) (CIM=CBM ≤ 400 mg/mL); e o extrato aquoso *Caryocar* sp. (Caryocaraceae) 400 mg/mL < CIM < 700 mg/mL, podendo estes extratos serem utilizados como antimicrobianos de uso veterinário contra *E. coli*.

No estudo de Ndjateu e colaboradores (2014) foi investigada a atividade antimicrobiana de dez compostos isolados, sendo eles [1-5 (a partir de *D. perkinsiae*), 2, 6-8 (a partir de *A. mannii*) e 2, 4, 9, e 10 (Fromb. fistulosa)]. Os resultados obtidos mostraram que o extrato etanólico de *D. perkinsiae* teve boa atividade antibacteriana contra *E. faecalis* (CIM = 0,04 e 0,08 mg/mL), *E. coli* e *S. aureus* (CIM = 0,08 mg/mL). Quanto aos compostos isolados, a atividade antimicrobiana moderada foi obtida com o composto 3 (quercetin 3-O-(6"-O-galloyl)-β-galactopyranoside) contra *E. faecalis* e *E. coli* (CIM de 16 µg/mL), os compostos 6 (isoprunitin) e 10 (shanzhiside methyl ester) contra *E. faecalis* (CIM de 16 µg/mL), e do composto 9 contra *E. faecalis* (CIM 31 µg/mL) e *S. aureus* (CIM 31 µg/mL).

Foi avaliado extratos de acetona de folhas de *Moringa oleífera* (Moringaceae) contra *E. coli*, *E. cloacae*, *P. vulgaris*, *S. aureus* e *M. kristina*. O extrato apresentou ação bactericida a 0,5 mg/mL contra *E. coli* e *M. kristinae* e bacteriostática frente *S. aureus*, *E. cloacae* e *P. vulgaris* (BUSANI et al., 2012).

O estudo de Ahmadizadeh e colaboradores (2014) avaliou a atividade antimicrobiana de extrato metanólico de *Artemisia vulgaris* (Asteraceae) contra *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. Os resultados obtidos mostraram que o extrato inibiu o crescimento de *S. aureus*, *B. cereus* e *E. coli* na concentração de 1.000 µg/mL.

No estudo de Saleem e colaboradores (2014) foi avaliada a atividade antimicrobiana através do método de diluição em caldo de extrato hexânico de *Vicia sativa* (Fabaceae) contra *B. atrophaeus*, *E. coli*, *S. epidermidis* e *S. aureus*. A CIM para *B. atrophaeus* foi 3,1 mg/mL, para *E. coli* foi 1,6 mg/mL, para *S. epidermidis* e *S. aureus* foi 6,3 mg/mL.

Du e Jin (2014) avaliaram a atividade antimicrobiana de extrato aquoso bruto e etanólico de *Aurantii nobilis pericarpium*, *Ginkgo biloba*, *Salvia miltiorrhiza* (Laminaceae), *Gall* e *Chebulae* contra *S. aureus* e *E. coli*. O extrato etanólico de *Chebulae* e *Gall* apresentou atividade bactericida para *S. aureus* numa CIM = 3,125 mg/mL e o extrato aquoso bruto teve ação bactericida contra *E. coli* numa CIM de 1,563 mg/mL.

Além disso, diversos estudos vêm sendo realizados para a avaliação do potencial antimicrobiano de plantas pertencentes à família Myrtaceae sendo que alguns deles serão apresentados a seguir. O estudo de Silva e colaboradores (2010) avaliou a atividade antimicrobiana do óleo de *Melaleuca thymifolia* (Myrtaceae) e os resultados demonstraram forte ação antimicrobiana contra todos os microrganismos avaliados, sendo que contra *E. coli* e *B. cereus* obteve-se CIM = 0.0625 mg/mL e CBM = 0,125 mg/mL e contra *S. aureus* – CIM = 0.0625 mg/mL e CBM = 0,0310 mg/mL.

No estudo de Gnanakalai & Gopal (2014) foram testados diferentes extratos de *Eucalyptus smithii* (Myrtaceae) contra *B. subtilis*, *P. aeruginosa* e *E. coli*, o extrato clorofórmico apresentou atividade significativamente maior frente a todos os patógenos, o extrato etanólico e acetônico mostraram atividade mínima e o extrato aquoso não apresentou nenhuma ação antimicrobiana.

Hussein e colaboradores (2014) avaliaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial da casca de *Cinnamomum zeylanicum* (Lauraceae) e das flores de *Syzygium aromaticum* (Myrtaceae) contra bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *S. pyogenes*) e Gram-negativas (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *S. marcescens*, *E. cloacae* e *K. pneumonia*). Os resultados obtidos da CIM dos óleos essenciais foi

1/256 contra *S. marcescens*, *E. cloacae*, *K. pneumonia* e *E. coli* demonstrando a possibilidade de utilização em produtos antimicrobianos.

Paula e colaboradores (2009) avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos brutos coletados em diferentes meses (I, II e III) de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Myrtaceae) pelo método de difusão em ágar e determinação da CIM. Os resultados mostraram que os extratos apresentam atividade antimicrobiana contra Gram-positivos – *S. aureus*, *M. luteus*, *M. roseus*, *B. cereus*, *B. atrophaeus* e *B. stearothermophilus* (CIM = 0,39062 para 12,5 mg/mL; CIM = 0,78125 para 1,5625 mg/mL e CIM = 0,39062 para 1,5625 mg/mL, respectivamente) contra Gram-negativos – *P. aeruginosa* (CIM = 0,39062 para 3,125 mg/mL; CIM = 1,5625 mg/mL e CIM = 0,78125 para 1,5625 mg/mL, respectivamente). A ação antimicrobiana dos extratos pode estar relacionada aos compostos fenólicos (taninos e flavonoides) presentes que podem variar de acordo com a época do ano e o local de coleta dos vegetais.

Foi avaliada a atividade antimicrobiana do extrato bruto metanólico de *Myrtus communis* L. (Myrtaceae) em diferentes concentrações contra quatro espécies de bactérias Gram-negativas (*E. coli*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa* e *C. jejuni*) e seis espécies de Gram-positivas (*S. aureus*, *M. luteus*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *L. monocytogenes*) onde o extrato inibiu o crescimento de todas as bactérias avaliadas com exceção de *C. jejuni* (ALEM et al., 2008; SUMBUL et al., 2011; ALIPOUR et al., 2014).

No estudo de Alem e colaboradores (2008) foi avaliado o extrato bruto de *Myrtus* (Myrtaceae) contra *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *K. aerogenes*, *S. typhi* e *S. shigella* os dados obtidos mostraram que a CIM para *S. aureus* foi de 0,5 mg/mL, para *P. mirabilis* e *P. vulgaris* foi 2,5 mg/mL, para *Klebsiella* spp. e *S. typhi* foi 15 mg/mL e para *P. aeruginosa* foi 20 mg/mL revelando forte ação antimicrobiana.

O estudo de Laham e Fadel (2014) investigou a ação antimicrobiana de extratos preparados a partir de diferentes partes de *Myrtus communis* Linn (Myrtaceae), contra *E. coli*. Os resultados encontrados mostraram que o extrato

etanólico de *Myrtus communis* apresentou ação antimicrobiana mais potente, sendo que o extrato de *Zingiber officinale* teve a menor ação.

O estudo de Yokomizo e Nakaoka-Sakita (2014) avaliou o potencial antimicrobiano do óleo essencial das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Myrtaceae) contra *A. niger*, *P. verrucosum*, *E. coli* e *S. aureus*. Os resultados mostraram que a inibição do crescimento bacteriano foi maior contra *P. verrucosum*, *A. niger* e *S. aureus* sendo que a menor inibição foi frente a *E. coli*.

O estudo de Hsouna e colaboradores (2014) avaliou a ação antimicrobiana do óleo essencial de *Myrtus communis* (Myrtaceae) contra bactérias Gram-positivas (*B. cereus*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *S. epidermis*, *B. subtilis*, *L. monocytogenes* e *M. luteus*) e Gram-negativas (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. enteritidis* e *K. pneumoniae*). Os resultados obtidos apresentaram CIM que variou de 0,078 – 2,5 mg/mL, sendo que a atividade antimicrobiana foi significativamente mais elevada contra as bactérias Gram-positivas do que as Gram-negativas. Assim, a planta estudada pode ser uma fonte potencial de ingrediente ativo as indústrias alimentícias e farmacêuticas.

O estudo de Lima e colaboradores (2013) avaliou a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Eucalyptus camaldulensis* (Myrtaceae) contra *S. aureus* e *E. coli*, os resultados mostraram que a CIM contra ambos os microrganismos foi de 8 µg/mL, sendo que tal atividade pode estar relacionada aos constituintes presentes na composição do óleo essencial, dentre eles: álcoois, fenóis, terpenos e cetonas.

Nota-se que extratos ou óleos essenciais obtidos de plantas pertencentes à família Myrtaceae apresentam atividade antimicrobiana frente a diferentes microrganismos, sejam eles Gram-positivos ou Gram-negativos. Esta ação varia entre as espécies, os métodos de obtenção, partes da planta utilizada, época e local de coleta e os solventes empregados para a extração dos constituintes químicos das mesmas.

O gênero *Eugenia* representa um grupo de plantas que apresenta em sua composição compostos bioativos com atividade antimicrobiana. O estudo de Holetz e colaboradores (2002) avaliou a ação antimicrobiana de extratos brutos de 13

plantas medicinais brasileiras: *Arctium lappa* Willd (Asteraceae), *Tanacetum vulgare* L. (Asteraceae), *Erythrina speciosa* Andrews (Leguminosae Papilionidae), *Psidium guajava* L. (Myrtaceae), *Mikania glomerata* Spreng (Asteraceae), *Spilanthes acmella* Mart. (Asteraceae), *Lippia alba* (Mill.) (Verbenaceae), *Achillea millefolium* L. (Asteraceae), *Piper regnellii* Miq. (Piperaceae), *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae), *Punica granatum* L. (Punicaceae), *Sambucus canadensis* L., *Plantago major* L. contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* e *S. aureus*. O extrato de *Eugenia uniflora* apresentou atividade moderada contra *E. coli* e *S. aureus* e o extrato de *P. guajava* atividade moderada (concentração entre 100 – 500 µg/mL) contra *E. coli*, *B. subtilis* e *S. aureus*.

Souza e colaboradores (2004) avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos brutos de metanol das espécies *Chaptalia nutans*, *Cordia monosperma*, *Echinodorus grandiflorus*, *Eugenia uniflora*, *Leonurus sibiricus*, *Luehea divaricata*, *Malva sylvestris*, *Ocotea odorifera*, *Parapiptadenia rigida*, *Pluchea sagittalis*, *Psidium cattleianum* e *Senna neglecta* contra *S. aureus*, *S. epidermidis*, *M. luteus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *C. albicans* e *S. cerevisiae*. Os resultados mostraram que *E. coli* (Gram-negativa) não foi inibida pelos extratos estudados, sendo que o microrganismo que teve maior inibição foi *B. subtilis* seguida por *M. luteus*, *S. cerevisiae*, *S. aureus* e *S. epidermidis*.

O estudo de Magina e colaboradores (2009) avaliou a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais das folhas de *Eugenia brasiliensis*, *Eugenia beaurepaireana* e *Eugenia umbelliflora* contra *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli*. Os resultados demonstraram que os óleos essenciais possuem atividade antimicrobiana que variou de moderada a forte, sendo mais acentuada para os óleos de *Eugenia umbelliflora* e *Eugenia brasiliensis* que inibiram fortemente o crescimento de *S. aureus* com CIM = 119,2 e 156,2 µg/mL, respectivamente.

O estudo de Bayoub e colaboradores (2010) avaliou a atividade antimicrobiana de extratos brutos etanólico de treze plantas: *Artemisia herba Alba* (Asteraceae), *Lavandula officinalis* L. (Labiatae), *Matricaria chamomilla* (Asteraceae), *Eugenia caryophyllata* (Myrtaceae), *Cistus salvifolius* (Cistaceae), *Mentha suaveolens* subsp. *Timija* (Lamiaceae), *Thymus serpyllum* L. (Lamiaceae), *Lippia citriodora*

(Verbenaceae), *Cinnamomum zeylanicum* (Myrtaceae), *Rosa centifolia* (Rosaceae), *Thymus vulgaris* L. (Lamiaceae), *Rosmarinus officinalis* (Labiatae) e *Pelargonium graveolens* (Geraniaceae) contra *L. monocytogenes* e outras estirpes bacterianas. Os resultados mostraram que a CIM dos extratos contra *L. monocytogenes* variou entre 0,25 – 11,75 mg/mL, sendo que o extrato de cravo apresentou atividade máxima numa CIM de 0,25 mg/mL seguido pelo extrato de hortelã timija (CIM de 0,315 mg/mL) ambos apresentando excelente atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes*, demonstrando a possibilidade de aplicação destes extratos em alimentos para evitar crescimento bacteriano aumentando a vida de prateleira dos alimentos.

No estudo Bussmann e colaboradores (2010) foi avaliada a CIM de extratos etanólico e aquoso de 141 espécies de plantas contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Os resultados mostraram que o extrato etanólico de 51 espécies inibiram *E. coli* e 114 inibiram *S. aureus* e 30 extratos aquosos apresentaram atividade contra *E. coli* e 38 extratos contra *S. aureus*, sendo que a atividade antimicrobiana mais interessante contra *E. coli* foi do extrato etanólico de *Baccaris* sp., *Ochroma pyramidale*, *Croton lechleri*, *Banisteriopsis caapii*, *Miconia salicifolia* e *Eugenia obtusifolia*.

Mohanakrishnan e colaboradores (2013) avaliaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) contra bactérias Gram-positivas (*S. aureus*, *B. subtilis*, *S. faecalis*, *S. albus*) e Gram-negativas (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. aerogenes* e *P. vulgaris*). Os resultados mostraram que o óleo possui ação antimicrobiana contra os quatro microrganismos Gram-positivos e é menos ativo contra os Gram-negativos.

O estudo de Chavasco e colaboradores (2014) avaliou a atividade antimicrobiana de extratos brutos de *Eugenia pyrifolia* Cambess (Myrtaceae) e demonstrou que os mesmos não têm atividade contra diversos microrganismos *P. mirabilis*, *E. coli*, *C. albicans*, *S. cerevisiae*, *M. bovis* e *M. tuberculosis* sendo que os resultados de CIM ficaram entre 12,5 – 50 mg/mL.

Tresina e Mohan (2014) investigaram a atividade antimicrobiana de extratos de folha de *Eugenia singampattiana* obtidos com diferentes solventes como éter de petróleo, benzeno, acetato de etila, metanol e etanol contra Gram-positivos (*B. thuringiensis*, *B. subtilis*, *S. aureus* e *E. faecalis*) e Gram-negativos (*S. paratyphi*, *P. mirabilis*, *E. coli*, *P. vulgaris*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *M. smegmatis*) os resultados demonstraram ação antimicrobiana com os extratos de éter de petróleo, metanol e etanol sendo que o extrato metanólico apresentou maior inibição contra *S. aureus*.

Analisando-se os estudos apresentados percebe-se que tanto extratos vegetais quanto óleos essenciais de plantas do gênero *Eugenia* 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. Estes dados condizem com o encontrado neste 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).

Dentre os estudos realizados sobre plantas da família Myrtaceae diversos estudos avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos de plantas do gênero *Psidium* contra diferentes patógenos. Um dos estudos foi o desenvolvido por Sanchez e colaboradores (2005) que avaliou a atividade antimicrobiana de extratos etanólico:água (1:1, 7:3 e 9:1) de folhas, raízes e caule de *Psidium guajava* L. (Myrtaceae) contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. fecalis*, *S. pyogenes*, *S. epidermidis*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *P. mirabilis* e *S. flexneri*. Os extratos demonstraram ser eficazes contra as bactérias Gram-positivas - *S. aureus* (CIM = 500, 125 e 250 µg/mL, respectivamente) e *B. subtilis* (CIM = 500 µg/mL), e praticamente inativo contra as bactérias Gram-negativas *E. coli* e *P. aeruginosa* (CIMs > 1.000 µg/mL).

No estudo de Nair & Chanda (2007) foi avaliada a atividade antimicrobiana de frações (metanol, acetona e N,N-dimetilformamida) das folhas de *Psidium guajava* (Myrtaceae). Os resultados demonstraram que os extratos apresentam ação

antimicrobiana mais pronunciada contra bactérias Gram-positivas e moderada frente Gram-negativa.

O estudo de Hema, Kumaravel e Elanchezhian (2009) avaliou a atividade antimicrobiana de extratos etanólico de *Piper nigrum* (pimenta preta), *Psidium guajava* (goiaba), *Amomum cardamomo* (cardamomo) e *Cynogen dactylon* (grama Bermuda) contra *P. lundensis*, *B. cereus*, *A. niger* e *A. flavus*. Os resultados mostraram que o extrato etanólico de *P. guajava* apresenta excelente atividade antimicrobiana contra todos os microrganismos avaliados apresentando o maior potencial de inibição.

Kuber e colaboradores (2013) avaliaram a atividade antimicrobiana de extrato etanólico da casca da raiz de *Psidium guajava* (Myrtaceae) pelo método de difusão em ágar em seis concentrações diferentes, sendo que a atividade antimicrobiana máxima foi obtida na concentração de 240 mg/mL contra *S. aureus* e *B. subtilis* e atividade moderada contra *P. vulgaris* e *E. coli*. O extrato apresentou atividade antimicrobiana mínima nas concentrações 10, 20, 40, 80 e 160 mg/mL frente a todos os microrganismos testados.

Richard e colaboradores (2013) avaliaram a ação antimicrobiana de extratos brutos de folhas e casca de *P. guajava* (Myrtaceae) contra *S. aureus* e *S. epidermidis*, os resultados mostraram que os extratos apresentam ação antimicrobiana sobre os microrganismos testados. Outro estudo foi o realizado por Bona e colaboradores (2014) que avaliou a atividade antimicrobiana de extratos brutos de três espécies da família Myrtaceae: *Psidium guajava*, *Myrciaria cauliflora* e *Syzygium cumini* contra as bactérias *B. subtilis* subsp. *spizizenii*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. 79tanólic* subsp., *P. aeruginosa* e *S. aureus*. A CIM dos extratos variou entre 0,39 e 100 mg/mL, onde contra as bactérias Gram-positivas a variação das CIMs foi de 6,25 – 100 mg/mL e de 0,39 a 25 mg/mL contra as Gram-negativas. Assim, neste estudo as bactérias Gram-negativas foram mais suscetíveis aos extratos testados.

No estudo de Chetia e colaboradores (2014) foi avaliada a atividade antimicrobiana de extratos (aquoso, metanólico, etanólico e de éter de petróleo) de

galhos jovens de *Psidium guajava* L. Os resultados obtidos mostraram que os extratos etanólicos possuem ação antimicrobiana contra *B. cereus* e *S. epiderme* e os extratos metanólicos ação contra *B. cereus*, *S. epidermis*, *E. coli*, *S. aureus* e *P. vulgaris*.

Egga e colaboradores (2014) testaram extratos brutos de metanol, hexano e acetato de etila de *P. guajava* (Myrtaceae) frente a *S. aureus*, *S. pyogenes*, *B. subtilis*, *C. albicans* e *P. aeruginosa*. Conclui-se que os extratos possuem atividade antimicrobiana contra todos os microrganismos testados, sendo o extrato metanólico o mais eficiente. O valor da CIM contra *B. subtilis* e *S. pyogenes* foi de 500 µg/mL, e 100 µg/mL contra *P. aeruginosa*, *C. albicans* e *S. aureus* estando tal atividade relacionada à presença de taninos e flavonoides.

No estudo realizado por Wildner (2014) que avaliou a ação antimicrobiana de extrato bruto aquoso e etanólico de *E. anomala*, *E. pitanga*, *E. arenosa* e *P. salutare* os resultados obtidos demonstraram que o extrato bruto etanólico de *P. salutare* apresentou ótima atividade antimicrobiana (CIM = 39 µg/mL) seguido pelo extrato bruto etanólico de *E. arenosa* (78 µg/mL).

Pode-se perceber 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-ADAMÉZ 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 demonstram efetividade maior contra microrganismos testados se comparados a outros tipos de extratos (ARIAS et al., 2004; SIMÕES et al., 2004).

Nota-se que extratos vegetais e óleos essenciais obtidos de plantas do gênero *Psidium* também podem apresentar ação antimicrobiana contra microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos sendo que dentre os estudos citados tal atividade é mais pronunciada contra os microrganismos Gram-positivos variando entre as espécies e microrganismos estudados, podendo também não haver tal atividade (extratos inativos). 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*.

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, pois os dados disponíveis destas espécies obtidos no presente trabalho e no estudo de Wildner (2014) comparando-se o emprego da técnica de esgotamento com solventes de polaridade distinta (hexano, clorofórmio, acetato de etila e etanol) e uso de extratos brutos (etanólico e aquoso), respectivamente, os extratos brutos apresentam melhor potencial de ação antimicrobiano que pode estar relacionada a ação sinérgica entre os constituintes bioativos das espécies vegetais.

4.1.5 Citotoxicidade *in vitro*

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 5 está apresentado o percentual de morte celular (%) e seu respectivo desvio padrão.

Tabela 5 – Morte celular (%) provocado pelos extratos de *E. anomala* e *P. salutare* 100 µg/mL

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

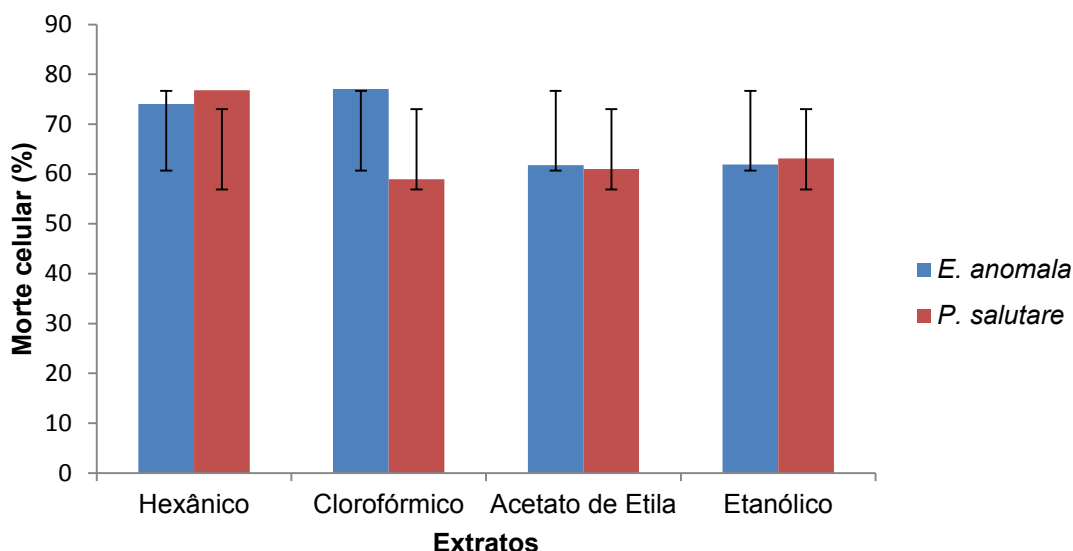
Pode-se observar que os extratos de ambas as espécies apresentaram mortalidade celular próximas ficando entre 58,95 a 77,05% sendo que entre a espécie *E. anomala* os extratos hexânico e clorofórmico apresentaram grau de mortalidade celular (%) mais elevado (74,04 ± 4,17 e 77,05 ± 1,29, respectivamente), enquanto na espécie *P. salutare* foi o extrato hexânico que teve percentual maior (76,79 ± 0,50).

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).

A Figura 21 mostra o perfil citotóxico dos extratos *E. anomala* e *P. salutare*. Nota-se que todos 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.

Figura 21 - Perfil citotóxico dos extratos de *E. anomala* e *P. salutare*



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

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 critérios do 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.

O estudo realizado por Wildner (2014) o qual avaliou a citotoxicidade *in vitro* de extratos brutos aquoso e etanólico de *E. anomala* e *P. salutare* demonstrou que o extrato bruto etanólico de ambas as espécies provoca maior morte celular de 60,57 e 52,99%, respectivamente. Ainda, foi determinado o IC50 dos extratos a uma concentração de 200 µg/mL e obteve-se um IC50 de 159 µg/mL para o extrato bruto de *E. anomala* e 179 µg/mL para o extrato de *P. salutare*. Desta forma, a partir dos resultados obtidos percebe-se que os extratos produzidos com o emprego de solventes com polaridades distintas os quais promovem a extração de substâncias diferentes em cada um deles conforme sua polaridade pode aumentar a ação citotóxica das espécies vegetais estudadas.

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.

Assim, 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).

5 CONCLUSÃO

Os extratos etanólico e de acetato de etila de *E. anomala* e *P. salutare* apresentaram atividade antioxidante com valores de IC50 inferiores a 50 µg/mL podendo estar relacionada a presença de flavonoides e compostos fenólicos extraídos com os solventes empregados.

A atividade antimicrobiana foi moderada somente com o extrato hexânico de *P. salutare* contra *L. monocytogenes* numa CIM = 325 µg/mL, sendo que os demais extratos não apresentaram tal atividade.

Todos os extratos estudados apresentaram ação citotóxica contra as células CHO-K1, sendo que os extratos clorofórmico de *E. anomala* e hexânico de *P. salutare* apresentaram elevada ação citotóxica (morte celular acima 75%) e os demais extratos ação citotóxica moderada, na concentração de 100 µg/mL.

Além disso, os extratos clorofórmico e hexânico de *E. anomala* apresentaram citotoxicidade interessante sugerindo assim seu emprego em estudos antitumorais uma vez que os valores de IC50 obtidos estão próximos ao estabelecido pelo INC para o emprego em agentes antineoplásicos.

O extrato hexânico de *P. salutare* apresentou moderada atividade antimicrobiana que pode estar relacionada à elevada ação citotóxica apresentada.

Desta forma, o presente estudo colaborou para a ampliação dos conhecimentos e geração de mais informações 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 avaliadas neste estudo e aprimoramento dos resultados.

PROPOSTA DE TRABALHOS FUTUROS

- Avaliação da atividade antitumoral dos extratos de *E. anomala* e *P. salutare*;
- Otimização do método de extração e avaliação dos constituintes químicos presentes nos extratos.

REFERÊNCIAS

- AHMADIZADEH, C.; MONADI, A.; REZAIE, A.; PASHAZADEH, M.; JAFARI, B. Antibacterial activity of methanolic extract and essence of Sagebrush (*Artemisia vulgaris*) against pathogenic bacteria. **Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences**, v. 3, n. 2, p. 121-125, 2014.
- ALEJANDRA, V.; DOMINGUEZ, G. G.; MARLANA, H. B. Fatores de virulência de *Listeria monocytogenes* e sua regulação. **Revista Chilena Infectologia**, v. 30, n. 4, p. 407-416, 2013.
- ALEM, G.; MEKONNEN, Y.; TIRUNEH, M.; MULU, A. *In vitro* antibacterial activity of crude preparation of Myrtle (*Myrtus communis*) on common human pathogens. **Ethiopian Medical Journal**, v. 46, p. 63–69, 2008.
- ALIGIANNIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINO, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4168–4170, 2001.
- ALIPOUR, G.; DASHTI, S.; HOSSEINZADEH, H. Review of Pharmacological Effects of *Myrtus communis* L. and its Active Constituents. **Phytotherapy Research**, v. 28, p. 1125-1136, 2014.
- ALVES, M. M.; SOARES PEREIRA, A. M.; PEREIRA, P. S.; CASTRO FRANÇA, S.; BERTONI, B. W. Caracterização química qualitativa de tinturas e extratos secos de plantas medicinais do Cerrado por cromatografia em camada delgada comparativa. **Scientia Plena**, v. 7, n. 12, p. 1-8, 2011.
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, 2010.
- ALZEER, J.; VUMMIDI, B. R.; ARAFEH, R.; RIMAWI, W.; SALEEM, H.; LUEDTKE, N. W. The influence of extraction solvents on the anticancer activities of Palestinian medicinal plants. **Journal Medicinal Plants Research**, v. 8, n. 8, p. 408-415, 2014.
- AMAROWICZ, R.; PEGG, R. B.; RAHIMI-MOGHADDAM, P.; BARL, B.; WEIL, J. A. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. **Food Chemistry**, London, v. 84, p. 551-562, 2004.
- ANDRADE, R. R. **Identificação microbiológica e diferenciação de espécies de *Listeria* spp. por análise de restrição de fragmentos de PCR (RFLP-PCR) em amostras de carnes e derivados comercializados no Distrito Federal**. 2008, 61f. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária – Universidade de Brasília, Brasília.

ARIAS, M.E.; GOMEZA, J.D.; CUDMANIB, N.M.; VATTUONEC, M.A.; ISLA, M.I. Antibacterial activity of ethanolic and aqueous extracts of *Acacia aroma* Gill. ex Hook et Arn. **Life Sciences**, v. 75, p. 191–202, 2004.

ASSIS, L. **Alimentos Seguros: Ferramentas para Gestão e Controle da Produção e Distribuição**. Rio de Janeiro: Senac Nacional, 2011.

BAE, H. D.; MCALLISTER T. A.; YANKE, J.; CHENG, K. J.; MUIR, A. D. Effects of condensed tannins on endoglucanase activity and filter paper digestion by *Fibrobacter succinogenes* S85. **Applied Environmental Microbiol.**, v. 59, p. 2132–2138, 1993.

BARANCELLI, G V.; SILVA-CRUZ, J. V.; PORTO, E.; OLIVEIRA, C. A. F. *Listeria monocytogenes*: ocorrência em produtos lácteos e suas implicações em saúde pública. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 78, n.1, p.155-168, 2011.

BAYOUB, K.; BAIBAI, T.; MOUNTASSIF, D.; RETMANE, A. Antibacterial activities of the crude ethanol extracts of medicinal plants against *Listeria monocytogenes* and some other pathogenic strains. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 27, p. 4251–4258, 2010.

BEELEN, P. M. G.; BERCHIELLI, T. T.; BUDDINGTON, R.; BEELEN, R. Efeito dos taninos condensados de forrageiras nativas do semi-árido nordestino sobre o crescimento e atividade celulolítica de *Ruminococcus flavefaciens* FD1. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 5, p. 910–917, 2006.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W. **Química de los Alimentos**. 2. ed. Saragoça: Acribia, 1997.

BENERE, E.; LUZ, R. A. I.; VERMEERSCH, M.; COS, P.; MAES, L. A new quantitative *in vitro* microculture method for *Giardia duodenalis* trophozoites. **Journal of Microbiological Methods**, v. 71, p. 101–106, 2007.

BIFFIN, E.; LUCAS, E. J.; CRAVEN, L. A.; COSTA, I. R. C.; HARRINGTON, M. G.; CRISP, M. Evolution of exceptional species richness among lineages of fleshy-fruited Myrtaceae. **Annals of Botany**, v. 106, p. 79–93, 2010.

BONA, E. A. M.; PINTO, F. G. S.; FRUET, T. K.; JORGE, T. C. M.; MOURA, A. C. 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**. [online], v. 81, n. 3, p. 218–225, 2014.

BRAGA, T. V.; DORES, R. G. R.; RAMOS, C. S.; EVANGELISTA, F. C. G.; TINOCO, L. M. S.; VAROTTI, F. P.; CARVALHO, M. G.; SABINO, A. P. Antioxidant, antibacterial and antitumor activity of ethanolic extract of the *Psidium guajava* leaves. **American Journal of Plant Sciences**, v. 5, p. 3492–3500, 2014.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. 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.

BRASIL, Ministério da Saúde. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Formulário Terapêutico Nacional 2010: RENAME 2010**. 2 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

BRUNTON, Laurence L. et al. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 12. ed. Porto Alegre: AMGH, 2012.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-53, 2004.

BUSANI, M.; JULIUS, M. P.; VOSTER, M. Antimicrobial activities of *Moringa oleifera* Lam leaf extracts. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 11, p. 2797-2802, 2012.

BUSSMANN, R. W.; MALCA-GARCÍA, G.; GLENN, A.; SHARON, D.; CHAIT, G.; DÍAZ, D.; POURMAND, K.; JONAT, B.; SOMOGY, S.; GUARDADO, C.; AGUIRRE, C.; CHAN, R.; MEYER, K.; KUHLMAN, A.; TOWNESMITH, A.; EFFIO-CARBAJAL, J.; FRÍAS-FERNANDEZ, F.; BENITO, M. Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, Leiden, v. 132, p. 101-108, 2010.

CAMARGO, L.R.P.; SUFFREDINI, I.B. Anti-*Escherichia coli* activity of Brazilian plant extracts: New trends in veterinary research. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 2, p. 617-620, 2014.

CARVALHO JR, A. R.; GOMES, G. A.; FERREIRA, R. O.; CARVALHO, M. G. 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.; VICTORIA, F. N.; OLIVEIRA, D. H.; JACOB, R. G.; SAVEGNAGO, L.; ALVES, D. Essential oil of *Psidium cattleianum* leaves: Antioxidant and antifungal activity. **Pharmaceutical Biology**, [Online], p. 1–9, 2014.

CEZAR, V. D. S.; MELLO, J. F.; CEZAR, G. S.; GELATTU, L. C.; COSTA, M. Susceptibilidade de cepas de *Listeria monocytogenes* isoladas em produtos lácteos no Rio Grande do Sul frente a diferentes desinfetantes. **Revista Fasem Ciências**. [Online], v. 3, n. 1, 2013.

CHAVASCO, J. M.; E FELIPHE, B. H. M.; CERDEIRA, C. D.; LEANDRO, F. D.; COELHO, L. F. L.; SILVA, J. J.; CHAVASCO, J. K.; DIAS, A. L. Evaluation of antimicrobial and cytotoxic activities of plant extracts from southern Minas Gerais Cerrado. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. [Online], v. 56, n.1, p. 13-20, 2014.

CHETIA, J.; UPADHYAYA, S.; BORA, D. K.; SAIKIA, L. R. 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.

CITOGLU, G. S.; ALTANLAR, N. Antimicrobial activity of some plants used in folk medicine. **Journal of Faculty of Pharmacy**, Ankara, v. 32, n. 3, p. 159-163, 2003.

CODEX, Alimentarius Commission. **Principle and Guidelines for the Conduct of Microbiological Risk Assessment**. CAC/GL 30, 1999.

COLLINS, L.; FRANZBLAU, S. G. Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. **Antimicrobial Agents Chemother**, v. 41, n. 5, p. 1004–1009, 1997.

CRUZ, A. V. M.; KAPLAN, M. A. C. Uso medicinal de espécies das famílias Myrtaceae e Melastomataceae no Brasil. **Floresta e Ambiente**, v. 11, n. 1, p. 47-52, 2004.

CRUZ, C. D.; MARTINEZ, M. B.; DESTRO, M. T. *Listeria monocytogenes*: um agente infeccioso ainda pouco conhecido no Brasil. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 19, n. 2, p. 195-206, 2008.

DALL'AGNOL, R.; FERRAZ, A.; BERNARDI, A. P.; ALBRING, D. C.; SARMENTO, L.; LAMB, L.; HASS, M.; POSER, G.; SCHAPOVAL, E. E. S. Antimicrobial activity of some *Hypericum* species. **Phytomedicine**, v. 10, p. 511-6, 2003.

DATASUS (2009). **Departamento de Informática do SUS**. Disponível em: <http://datasus.saude.gov.br/>.

DELGADO-ADÁMEZ, J.; FERNÁNDEZ-LEÓN, M. F.; VELARDO-MICHARET, B.; GONZÁLEZ-GÓMEZ, D. *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.

DU, Z.; JIN, M. **Human Health and Medical Engineering**, ed. WitPress, United Kingdom, 2014.

EGGA, E.S.; ADEYANJU, O.; AGYENO, O.E. 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.; OKEMO, P. O.; ANSORG, R. Antibacterial activity of East African medicinal plants. **Journal Ethnopharmacology**, v. 60, p. 79-84, 1998.

FALCAO, D. Q.; COSTA, E. R.; ALVIANO, D. S.; ALVIANO, C. S.; KUSTER, R. M.; MENEZES, F. S. Atividade antioxidante e antimicrobiana de *Calceolaria chelidonioides* Humb. Bonpl. & Kunth. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. [Online], v. 16, n. 1, p. 73-76, 2006.

FERNANDES, M. R. V.; AZZOLINI, A. E. C. S.; MARTINEZ, M. L. L.; SOUZA, C. R. F.; LUCISANO-VALIM, Y. M.; OLIVEIRA, W. P. 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.

FIUZA, T. S.; REZENDE, M. H.; SABÓIA-MORAIS, S. M. T.; BARA, M. T. F.; TRESVENZOL, L. M. F.; PAULA, J. R. Caracterização farmacognóstica das folhas de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 5, n. 2, p. 21-31, 2008.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. 2. ed. Porto Alegre, Artmed, 2013.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Microrganismos patogênicos de importância em alimentos. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996, cap.4, p. 33-82.

FRANZON, R.; CAMPOS, L. Z. O.; PROENÇA, C. E. B.; SILVA, J. C. S. **Araças do Gênero *Psidium*: principais espécies, ocorrência, descrição e usos**. Brasília, DF: Embrapa Cerrados, 2009.

GABRIELSON, J.; HART, M.; JARELO, A.; KUHN, I.; MCKENZIE, D.; MOLLBY, R. 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.

GARMUS, T. T.; PAVIANIA, L. C.; QUEIROGA, C. L.; MAGALHÃES, P. M.; CABRAL, F. A. Extraction of phenolic compounds from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) leaves by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO₂, ethanol and water as solvents. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 86, p. 4–14, 2014.

GERMANO, P. M. L., GERMANO, M. I. S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. 4. ed. Barueri, SP: Manole, 2011.

GIEHL, E. L. H. (coordenador). 2012. Flora Digital do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina. URL: <http://ufrgs.br/floradigital>.

GNANAKALAI, K.; GOPAL, R. Evaluation of antibacterial potential of *Eucalyptus smithii* bark extracts against some bacterial strains. **International Journal of Biosciences and Nanosciences**, v. 1, n. 2, p. 42-45, 2014.

GOVAERTS, R.; SOBRAL, M.; ASHTON, P.; BARRIE, F.; HOLST, B. K.; LANDRUM, L. R.; MATSUMOTO, K.; MAZINI, F. F.; NIC LUGHADHA, E.; PROENÇA, C. E. B.; SILVA, L. H. S.; WILSON, P. G.; LUCAS, E. J. **World Checklist of Myrtaceae**, Kew: Royal Botanic Gardens, v.1, 2008.

HAMILL, F. A.; APIO, S.; MUBIRU, N. K.; BUKENYA-ZIRABA, R.; MOSANGO, M.; MAGANYI, O. W.; SOEJARTO, D. D. Traditional herbal drugs of Southern Uganda II: literature analysis and antimicrobial assays. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 84, p. 57–78, 2003.

HEMA, R.; KUMARAVEL, S.; ELANCHEZHIAN, N. 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.; ZAITON, H.; SUHAILA, M. Bacterial membrane disruption in food pathogens by *Psidium guajava* leaf extracts. **International Food Research Journal**, v. 16, p. 297-311, 2009.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. L.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. D. *Screening* of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. [Online], v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HSOUNA, A. B.; HAMDIB, N.; MILADI, R.; ABDELKAFI, S. *Myrtus communis* essential oil: Chemical composition and antimicrobial activities against food spoilage pathogens. **Chemistry & Biodiversity**, v. 11, 2014.

HUSSEIN, H. A.; ABAAS, I. S.; ALI, R. H. Antibacterial activities of *Cinnamomum zelanicum* *syzygium aromaticum* essential oil. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 5, 2014.

ITHARATA, A.; HOUGHTON, P. J.; ENO-AMOOQUAYEC, E.; BURKE, P. J.; SAMPSON, J. H.; RAMAN, A. *In vitro* cytotoxic activity of thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, p. 33–38, 2004.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre, Artmed, 2005.

JEMMI, T.; STEPHAN, R. *Listeria monocytogenes*: food-borne pathogen and hygiene indicator. **Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties**, Paris, v. 25, n. 2, p. 571-580, 2006.

JOHN, K. M. M.; AYYANAR, M.; JEEVA, S.; SURESH, M.; ENKHTAIVAN, G.; KIM, D. H. 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, p. 11, 2014.

JONES, G. A.; MCALLISTER, T. A.; MUIR, A. D.; CHENG, K. J. Effect of sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) condensed tannins on growth and proteolysis by four strains of ruminal bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 1374-1378, 1994.

KANOUN, K.; BELYAGOUBI-BENHAMMOU, N.; GHEMBAZA, N.; BEKKARA, A. Comparative studies on antioxidant activities of extracts from the leaf, stem and berry of *Myrtus communis* L. **International Food Research Journal**, v. 21, n. 5, p. 1957-1962, 2014.

KESZEI, A.; BRUBAKER, C. L.; CARTER, R.; KOLLNER, T.; DEGENHARDT, J.; FOLEY, W. J. Functional and evolutionary relationships between terpene synthases from Australian Myrtaceae. **Phytochemistry**, v. 71, p. 844–852, 2010.

KUBER, B. R.; LAKSHMI, M. R.; DEEPIKA, E.; YAMINI, P. Phytochemical screening *in vitro* anti-bacterial and antioxidant activity of the *Psidium guajava* root bark. **International Journal Current Microbiol Applied Sciences**, v. 2, n. 10, p. 238-248, 2013.

KUMAR, G.; KARTHIK, L.; RAO, K. V. B. Antibacterial activity of aqueous extract of *Calotropis gigantea* leaves – an *in vitro* study. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 4, n. 2, 2010.

LAHAM, S. A. A.; FADEL, F. M. A. Screening the antimicrobial activity of some medicinal plants against multidrug resistance *Escherichia coli* type. **Asian Journal Pharmaceutical Research Health Care**, v. 6, n. 1, 2014.

LANDRUM, L. R.; KAWASAKI, M. L. **The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys**. Brittonia, v. 49, p. 508–536, 1997.

LAPCIK, O.; KLEJDUS, B.; KOKOSKA, L.; DAVIDOVA, M.; AFANDI, K.; KUBANB, V.; HAMPL, R. Identification of isoflavones in *Acca sellowiana* and two *Psidium* species (Myrtaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, p. 983-992, 2005.

LARRAIN, D.C; CARVAJAL, J. Los aspectos fisiopatológicos y moleculares involucrados em el traspaso de *Listeria monocytogenes* através de la barrera placentária (uma revisão bibliográfica). **Boletín Escuela de Medicina – Pontificia Universidad Católica de Chile**, v. 33, n. 1, 2008.

LEE, O.H., LEE, B.Y. Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. **Bioresource Technol.**, n. 101, p. 3751–3754, 2010.

LIMA, L. M.; BABAKANI, B.; BOLDAJI, S. A. H.; ASADI, M.; BOLDAJI, R. M. Essential oils composition and antibacterial activities of *Eucalyptus camaldilensis* Dehn. **Int. J. Med. Arom. Plants**, v. 3, n. 2, p. 214-219, 2013.

LUCAS, E. J., HARRIS, S. A.; MAZINE, F. F. **Suprageneric phylogenetics of Myrteae, the generically richest tribe in Myrtaceae (Myrtales)**, Taxon, v 56, p. 1105–1128, 2007.

MAGINA, M. D.; DALMARCO, E. M.; WISNIEWSKI JR, A.; SIMIONATTO, E. L.; DALMARCO, J. B.; PIZZOLATTI, M. G.; BRIGHENTE, I. M. C. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of *Eugenia* species. **Journal of Natural Medicines**, Tokyo, v. 63, n. 3, p. 345-350, 2009.

MAHMOUD, T. S.; MARQUES, M. R.; PESSOA, C. O.; LOTUFO, L. V. C.; MAGALHÃES, H. I. F.; MORAES, M. O.; LIMA, D. P.; TININIS, A. G.; OLIVEIRA, J. E. *In vitro* cytotoxic activity of Brazilian middle west plant extracts. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, n. 3, p. 456-464, 2011.

MANTILLA, S.; FRANCO, R. M.; OLIVEIRA, L. A. T.; SANTOS, E. B.; GOUVÊA, R. Importância da *Listeria monocytogenes* em alimentos de origem animal. **Revista da FZVA**, v. 14, n. 1, p.180-192, 2007.

MCLAUCHLIN, J.; MITCHELL, R. T.; SMERDON, R. J.; JEWELL, K. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterization for use in microbiological risk assessment of foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 92, p. 15-33, 2004.

MENDONÇA, M. **Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra InIA de *Listeria monocytogenes***. 2008. 71f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Faculdade de Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

MOHANAKRISHNAN, M.; SUBBURAJ, M.; PRADEEPKUMAR, K. M.; SHAFI, P.M. Composition and antimicrobial activities of the essential oil from *Eugenia uniflora* L. leaves growing in India. **International Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, v. 4, n. 1, p. 46-49, 2013.

MORENO, M. A.; ZAMPINI, C.; COSTAMAGNA, M.; SAYAGO, J. E.; ORDOÑES, R. M.; ISLA, M. I. Phytochemical composition and antioxidant capacity of *Psidium guajava* fresh fruits and flour. **Food and Nutrition Sciences**, v. 5, p. 725-732, 2014.

MORENO, L. Z. **Pesquisa de genes de virulência em cepas de *Listeria monocytogenes* e *Listeria innocua* originárias de carne suína e ambiente de abatedouros e açougues**. 2013. 115 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública - Universidade de São Paulo, São Paulo.

MORESCO, H. H.; PEREIRA, M.; BRETANHA, L. C.; MICKE, G. A.; PIZZOLATTIA, M. G.; BRIGHENTE, I. M. C. Myricitrin as the main constituent of two species of *Myrcia*. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 4, n. 2, p. 001-007, 2014.

MOURA, F. M. L.; BAPTISTA, R. I. A. A.; SANTOS, V. V. M.; MOURA, A. P. B. L.; COSTA, M. M. Utilização de plantas do bioma Caatinga no controle de patógenos de interesse na área de alimentos – Uma revisão. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 7, n. 2, p. 125-136, 2013.

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.

NDJATEU, F. S. T.; TSAFACK, R. B. N.; NGANOU, B. K. ; AWOUAFACK, M. D.; WABOA, H. K.; TENE, M.; TANE, P.; ELOFF, J. N. Antimicrobial and antioxidant activities of extracts and ten compounds from three Cameroonian medicinal plants:

Dissotis perkinsiae (Melastomaceae), *Adenocarpus mannii* (Fabaceae) and *Barteria fistulosa* (Passifloraceae). **South African Journal of Botany**, v. 91, p. 37–42, 2014.

NELSON, K. E.; PELL, A. N.; DOANE, P. H.; GINER-CHAVEZ, B. I.; SCHOFIELD, P. Chemical and biological assays to evaluate bacterial inhibition by tannins. **Journal of Chemical Ecology**, v. 23, p. 1175-1194, 1997.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal Biochemistry**, v. 267, p. 5421-5426, 2000.

OSTROSKY, E.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CIM) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PAULA, J. A. M.; PAULA, J. R.; PIMENTA, F. C.; REZENDE, M. H.; BARA, M. T. F. Antimicrobial activity of the crude ethanol extract from *Pimenta pseudocaryphyllus*. **Pharmaceutical Biology**, v. 47, n. 10, p. 987–993, 2009.

PERES, N. D.; LANGELL, C. C.; BRITOLL, M. A. V. P.; ARCURILL, E. F.; CERQUEIRA, M. M. O. P. Detecção de *Listeria monocytogenes* pela técnica de PCR em leite contaminado artificialmente. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 4, p. 973-979, 2010.

PIETRO, R. C. L. R.; KASHIMA, S.; SATO, D. N.; JANUARIO, A. H.; FRANCA, S. C. *In vitro* antimycobacterial activities of *Physalis angulata* L. **Phytomedicine**, v. 7, n. 4, p. 335-338, 2000.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

RAMOS, L. P. ***Listeria monocytogenes* em linguças do tipo frescal vendidos a varejo no município de Salvador-BA e eficácia do bacteriófago P100 no controle da contaminação pelo patógeno**. 2009. 105 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Farmácia - Universidade Federal da Bahia, Salvador.

REYNERTSON, K. A.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Antioxidant potential of seven Myrtaceous fruits. **Ethnobotany Research & Applications**, v. 3; p. 25-36, 2005.

RIBEIRO, D. S.; VELOZO, E. S.; GUIMARÃES, A. G. Interaction between the rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis* L.) and antimicrobial drugs in the control of bacteria isolated from foods. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, n. 1, p. 10-19, 2013.

RICHARD, F. T.; JOSHUA, A. T.; PHILIPS, A. J. Effect of aqueous extract of leaf and bark of guava (*Psidium guajava*) on fungi *Microsporum 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.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILLAR, A. *Screening* methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 23, p. 127–149, 1988.

ROLON, M.; VEGA, C.; ESCARIO, J. A.; BARRIO-GOMEZ, A. Development of Resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitology Research**, v. 99, p. 103–107, 2006.

SALEEM, M.; KARIM, M.; QADIR, M. I.; AHMED, B.; RAFIQ, M.; AHMAD, B. *In vitro* antibacterial activity and phytochemical analysis of hexane extract of *Vicia sativa*. **Bangladesh Journal Pharmacology**, v. 9, p. 189-193, 2014.

SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; SCHIAVINI, M. S.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. An evaluation of antibacterial activities of *Psidium guajava* (L.). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 3, p. 429-436, 2005.

SANTOS, T. G.; REBELO, R. A.; DALMARCO, E. M.; GASPER, A. L. G.; CRUZ, A. B.; SCHMIT, A. P.; CRUZ, R. C. B.; STEINDEL, M.; NUNES, R. K. Composição química e avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de *Piper malacophyllum* (C. PRESL.) C. DC. **Química Nova**, v. 35, n. 3, p. 477-481, 2012.

SCHWAB, J. P.; EDELWEISS, M. I. A. Identificação imuno-histoquímica de *Listeria monocytogenes* em placentas fixadas em formol e embebidas em parafina. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 7, 2003.

SEO, J.; LEE, S.; ELAM, M. L.; JOHNSON, S. A.; KANG, J.; ARJMANDI, B. H. 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.; MADAKA, F.; SUEREE, L.; KITTIWISUT, S.; SAKUNPAK, A.; MOTON, C.; CHAROENCHAI, L. 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.

SEYYEDNEJAD, S. M.; MOTAMED, H.; VAFEI, M.; BAKHTIARI, A. The antibacterial activity of *Cassia fistula* organic extracts. **Jundishapur Journal Microbiology**, v. 7, n.1, p. 8921, 2014.

SILVA, C. J.; BARBOSA, L. C.; DEMUNER, A. J.; MONTANARI, R. M.; PINHEIRO, A. L.; DIAS, I.; ANDRADE, N. J. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de espécies de Myrtaceae plantadas no Brasil. **Química Nova**, v.33, n. 1, p. 104-108, 2010.

SILVA JR, E. A. **Manual de Controle Higiênico-sanitário em Serviços de Alimentação**, São Paulo: Varela, 1995.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre 2004.

SOBRAL, M; JARENKOW, J. A.; BRACK, P.; IRGANG, B.; LAROCCA, J.; RODRIGUES, R. S. **Flora Arbórea e Arborescente do Rio Grande do Sul, Brasil**. Rima: Novo Ambiente, Porto Alegre, 2006.

SOUZA, G. C.; HASS, A. P. S.; POSER, G. L.; SCHAPOVAL, E. E. S.; ELISABETSKI, E. Ethnopharmacology studies of antimicrobial remedies in south of Brasil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, p. 135-143, 2004.

SPRINGER, J. E.; AZBILL, R. D.; CARLSON, S. L. A rapid and sensitive assay for measuring mitochondrial metabolic activity in isolated neural tissue Brain. **Research Protocols**, v. 2, p. 259–263, 1998.

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.

SUMBUL, S; AHMAD, M. A; ASIF, M.; AKHTAR, M. *Myrtus communis* Linn. - A review. **Indian Journal of Natural Products and Resources**, v. 2, n. 4, p. 395-402, 2011.

TANAKA, J. C. A.; SILVA, C. C.; DIAS FILHO, B. D.; NAKAMURA, C. V.; CARVALHO, J. E.; FOGLIO, M. A. Constituintes químicos de *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae). **Química Nova**, v. 5, p. 834-7, 2005.

TCHANA, M. E. S.; FANKAM, A. G.; MBAVENG, A. T.; NKWENGOUA, E. T.; SEUKEP, J. A.; TCHOUANI, F. K.; NYASSÉ, B.; KUETE, V. Activities of selected medicinal plants against multi-drug resistant Gram-negative bacteria in Cameroon. **African Health Sciences**, v. 14, n. 1, 2014.

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.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10 ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

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.; SARI, F.; VELIOGLU, Y. S. 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.

VELIOGLU, Y. S.; NAZZA, G.; GAO, L.; OOMAH, B. D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, n. 10, p. 4113-4117, 1998.

VUOTTO, M. L.; BASILE, A.; MOSCATIELLO, V.; DE SOLE, P.; CASTALDO-COBIANCHI, R.; LAGHI, E.; LELPO, M. T. L. Antimicrobial and antioxidant activities of *Feijoa sellowiana* fruit. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 13, p. 197-201, 2000.

YADAV, S.; KUMAR, S.; JAIN, P.; PUNDIR, R. K.; JADON, S.; SHARMA, A.; KHETWAL, K. S.; GUPTA, K. C. Antimicrobial activity of different extracts of roots of *Rumex nepalensis* Spreng. **Indian Journal of Natural Products and Resources**, v. 2, n. 1, p. 65-69, 2011.

YOKOMIZO, N. K. S.; NAKAOKA-SAKITA, M. Atividade antimicrobiana e rendimento do óleo essencial de *Pimenta pseudocaryophyllus* var. *pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum, Myrtaceae. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais** [Online], v. 16, n. 3, p. 513-520, 2014.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis - A Thin Layer Chromatography Atlas**. 2 ed. Germany. 1996.

WERBROUCK, H.; BOTTELDOORN, N.; VAN PAMEL, E.; RIJPENS, N.; VAN D. J.; UYTENDAELE, M.; HERMAN, L.; VAN COILLIE, E. Differential *inlA* and *inlB* expression and interaction with human intestinal and liver cells by *Listeria monocytogenes* strains of different origins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 6, p. 3862-3871, 2006.

WESTON, R. J. Bioactive products from fruit of the feijoa (*Feijoa sellowiana*, Myrtaceae): A review. **Food Chemistry**, v. 121, p. 923–926, 2010.

WHO/FAO. Food and Agriculture Organization/World Health Organization. **Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods**, 2004. Disponível em: <<http://www.who.int/foodsafety>>. Acesso em 20 nov. 2014.

WILDNER, G. R. **Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Extratos de Plantas Nativas do RS frente à *Listeria monocytogenes***. 2014. 117 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – Centro Universitário UNIVATES, Lajeado.

WILLIAMS, R. J.; HEYAMNN. Containment of antibiotic resistance. **Science**, v. 279, p. 1153-1154, 1998.

WILSON, P. G., O'BRIEN, M. M.; GADEK, P. A.; QUINN, C. J. Myrtaceae revisited: a reassessment of infra familial groups. **American Journal of Botany**, v. 88, n. 11, p. 2013-2025, 2001.

WILSON, P. G., O'BRIEN, M. M.; HESLEWOOD, M. M.; QUINN, C. J. Relationships within Myrtaceae sensu lato based on a matk phylogeny. **Plant Systematics and Evolution**, v. 251, p. 3-19, 2005.