



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ – UFC
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM – FFOE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS

ANA LUIZA RIBEIRO AGUIAR

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO BRUTO HIDROALCOÓLICO
SECO DE FOLHAS MADURAS DE**

Psidium guajava L.

FORTALEZA

2016

ANA LUIZA RIBEIRO AGUIAR

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO BRUTO HIDROALCOÓLICO
SECO DE FOLHAS MADURAS DE**

Psidium guajava L.

Monografia apresentada ao curso de Farmácia
da Universidade Federal do Ceará, como
requisito parcial para obtenção do título de
Farmacêutico.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Nádia Accioly Pinto
Nogueira.

Coorientador: Dr. Gleilton Weyne Passos
Sales - Farmacêutico

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

A227a Aguiar, Ana Luiza Ribeiro.

Atividade antimicrobiana do extrato bruto hidroalcoólico seco de folhas maduras de *Psidium guajava L.* / Ana Luiza Ribeiro Aguiar. – 2016.

63 f. : il. color.

Monografia (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Departamento de Farmácia, Curso de Farmácia, Fortaleza, 2016.

Orientação: Profa. Dra. Nádia Accioly Pinto Nogueira.

Co-Orientação: Prof. Dr. Gleiton Weyne Passos Sales.

1. Produtos com Ação Antimicrobiana. 2. Psidium. 3. Plantas Medicinais. I. Título.

CDD 615.32

ANA LUIZA RIBEIRO AGUIAR

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO BRUTO HIDROALCOÓLICO
SECO DE FOLHAS MADURAS DE**

Psidium guajava L.

Monografia submetida à Coordenação do Curso de Graduação em Farmácia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Farmacêutico.

Aprovada em 20 /01/2016.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Nádia Accioly Pinto Nogueira (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof^a. Dr^a. Renata de Sousa Alves
Universidade Federal do Ceará – UFC

Dr. Gleilton Weyne Passos Sales
Farmacêutico - Universidade Federal do Ceará – UFC

À minha mãe, Maria de Nasaré Ribeiro,
por todo apoio, dedicação e incentivo.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por sua presença em todos os momentos da minha vida e por ter me dado força e coragem para continuar nessa caminhada.

À minha mãe **Nasaré**, por todo apoio, amor e dedicação depositados em mim, durante toda a minha vida. À minha mãe **Christianne**, por ter me gerado, por ser minha amiga e me apoiar quando preciso.

Ao meu namorado **Glailton Robson**, por ser meu companheiro, por compartilhar sonhos comigo, por ser paciente nas horas necessárias e por me ensinar, de forma tão espontânea e natural, a ser uma pessoa melhor.

À minha orientadora, **Profª. Dra. Nádia Accioly Pinto Nogueira**, por me acolher em seu laboratório, por acreditar em mim e me ajudar na concretização deste projeto.

Ao meu coorientador, **Dr. Gleilton Weyne Passos Sales**, por todo apoio, pelas correções e pelos ensinamentos destinados a mim durante este trabalho.

Aos meus amigos da graduação, especialmente o **Nickolas Marlles**, a **Mariana Bona**, a **Kelly Kaliana** e a **Rita de Cássia**, que me acompanharam nos trabalhos e nos estudos para as provas. Com certeza, essa amizade não se resumirá à graduação, mas se estenderá para a vida.

Ao meu **avô Bosco**, sua querida esposa **Virgínia**, suas filhas **Priscilla Aguiar** e **Bruna Aguiar** e aos nossos anjinhos **João Caio** e **Yasmin**, todos vocês, além de minha família, são um porto seguro, onde eu descanso e com quem sou muito feliz. Muito obrigada por me acolher na casa de vocês e, principalmente, em seus corações, ainda teremos muitas vitórias e momentos felizes juntos, eu amo vocês.

Aos meus amigos **Gisele Arruda** e **Pedro Olímpio**, que me acompanharam desde a infância e a época do colégio, vocês também fazem parte da concretização deste sonho. Espero que possamos estar sempre juntos comemorando nossas conquistas.

Aos meus amigos **David Fernandes**, **Tetê**, **Urubu**, **Anajara**, **João**, **Lella**, **Camilo**, **Simony**, **Felipe da Maria**, **Andréia**, **Walisson** e **Ana Lígia**, que fazem parte da minha vida há dois anos, mas já são uma família pra mim, eles também fazem parte dessa vitória.

Ao **Matheus Lima Rodrigues**, bolsista de Iniciação Científica do Laboratório de Microbiologia Aplicada, pela contribuição dada na realização dos procedimentos experimentais.

À **Profª. Dra. Renata de Souza Alves**, por aceitar o convite para participação da banca e, assim, contribuir nessa importante fase do meu trabalho.

Aos integrantes do grupo **PET/UFC-Farmácia**, que contribuíram imensamente para o meu aprendizado nas áreas de pesquisa, ensino e extensão e me ensinaram a importância de saber lidar com as diferenças e trabalhar em equipe.

Ao **Horto de Plantas Medicinais Prof. Francisco José de Abreu Matos da Universidade Federal do Ceará**, pela disponibilização do material vegetal para ser estudado neste trabalho.

Aos **professores da Universidade Federal do Ceará**, que passaram por minha vida durante a graduação, pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

A todas as pessoas que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho, o meu MUITO OBRIGADA!

“Para realizar grandes conquistas, devemos não apenas agir, mas também sonhar; não apenas planejar, mas também acreditar.”

Anatole France

RESUMO

A *Psidium guajava L.* (goiabeira) é utilizada popularmente no tratamento de várias enfermidades. É comum o uso de chás das folhas jovens (brotos) para combater os sintomas de infecção gastrointestinal, sendo as folhas maduras e as secas menos citadas. Entretanto, os brotos estão em pequena quantidade nas árvores, e o estudo das folhas maduras é importante para a comprovação de que possuem substâncias ativas suficientes para manter atividade antimicrobiana encontrada nos brotos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana e moduladora do extrato bruto hidroalcoólico seco (EBHSPg) obtido a partir das folhas maduras de *Psidium guajava L.* O material foi coletado no horto de plantas medicinais José de Abreu Matos e utilizado para obtenção do EBHSPg 10%. Através de testes fitoquímicos, foi verificada a presença de flavonóides, taninos pirogálicos, saponinas e triterpenóides. O potencial antimicrobiano foi determinado pelo método de difusão em ágar, a Concentrações Inibitórias Mínima (CIM) pelo método de microdiluição em caldo e a Concentração Letal Mínima (CLM) pela técnica de contagem por micropota, sobre as cepas microbianas de referência *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Salmonella cholerae-suis* subespécie *cholerae-suis* ATCC 10708 e *Candida albicans* ATCC 10231. A atividade moduladora do extrato na ação de antibióticos de uso clínico (Gentamicina 30 μ g, Cefoxitina 30 μ g, Ciprofloxacina 5 μ g e Ampicilina 10 μ g) foi testada pelo método de disco-difusão modificado, sobre *P. aeruginosa*, *S. cholerae-suis* e *S. aureus*, cepas que apresentaram maior sensibilidade ao EBHSPg. Na técnica de difusão em ágar, a cepa *S. cholerae-suis* apresentou maior sensibilidade, com o diâmetro dos halos de inibição de 19 a 23 mm, seguido de *P. aeruginosa* (7 a 11,5mm), *S. aureus* (7 a 10,5mm) e *E. coli* (7,5mm). Porém, o EBHSPg, nas concentrações testadas, não apresentou inibição sobre *C. albicans*. A menor concentração em que houve formação de HI foi de 25 mg/mL de extrato, inibindo o crescimento das cepas *S. cholerae-suis* e *P. aeruginosa*. Nos testes de microdiluição, a menor CIM do EBHSPg encontrada foi de 5 mg/mL para *P. aeruginosa* e *S. cholerae-suis*. Não foi possível determinar a CLM nas concentrações do EBHSPg testadas. O EBHSPg apresentou sinergismo apenas quando associado à ampicilina sobre as cepas *P. aeruginosa* e *S. cholerae-suis*. As associações dos outros antibióticos usados e EBHSPg apresentaram 77,8% e 22,20% de efeito indiferente e antagônico, respectivamente, sobre as cepas testadas. Os resultados mostram que as folhas maduras de *P. guajava L.* possuem substâncias com ação

antimicrobiana capazes de modular positivamente a atividade da ampicilina sobre *P. aeruginosa* e *S. cholerae-suis*, podendo ser uma alternativa ao uso de folhas jovens. Porém, é preciso que se façam novas pesquisas para determinar o mecanismo de ação desse produto vegetal, assim como novos ensaios de toxicidade que forneçam base para o uso seguro dessa planta pela população.

Palavras-chave: *Psidium*; produtos com ação antimicrobiana; plantas medicinais.

ABSTRACT

The *Psidium guajava* L. ("guava") is popularly used in the treatment of various diseases. It is common to use teas from young leaves (sprouts) to combat the symptoms of gastrointestinal infection, already mature leaves and dry leaves are less cited. However, the sprouts are in small amount in the trees. The study of mature leaves is important to prove that they have enough active substances to keep antimicrobial activity found in sprouts. The objective of this study was to evaluate the antimicrobial activity and modulating of dry raw hydroalcoholic extract (EBHSPg) obtained from the mature leaves of *Psidium guajava* L. The material was collected in the garden of medicinal plants José de Abreu Matos and used for obtaining EBHSPg 10%. Through phytochemical tests, it was verified the presence of flavonoids, pirogálicos tannins, saponins and triterpenoids. The antimicrobial potential was determined by agar diffusion method, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) by the microdilution broth method and the Minimum Lethal Concentration (MLC) by counting technique microdrop on microbial strains reference *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *E. coli* ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Salmonella cholerae-suis* ATCC 10708 subespécie *cholerae-suis* ATCC 10231 and *Candida albicans* ATCC 10231. The modulating activity of the extract in action in clinical use antibiotics (Gentamicin 30 μ g, Cefoxitin 30 μ g, Ciprofloxacin 5 μ g and Ampicillin 10mg) was tested by disk diffusion method modified on *P. aeruginosa*, *S. cholerae-suis* and *S. aureus*, strains that showed higher sensitivity EBHSPg. The diffusion technique in agar, the *S. cholerae-suis* strain showed higher sensitivity, with the diameter of the inhibition zones 19-23 mm, followed by *P. aeruginosa* (7 to 11.5mm), *S. aureus* (7 to 10.5mm) and *E. coli* (7.5mm). But the EBHSPg at the tested concentrations showed no inhibition on *C. albicans*. The lowest concentration at which there was formation of HI was 25 mg / mL of extract, inhibiting the growth of *S. cholerae-suis* strains and *P. aeruginosa*. In the microdilution tests, the lowest CIM of EBHSPg was found to be 5 mg / ml for *P. aeruginosa*, and *S. cholerae-suis*. Could not determine the CLM in EBHSPg concentrations tested. The EBHSPg showed synergism only when associated with ampicillin on *P. aeruginosa* strains and *S. cholerae-suis*. The associations of other antibiotics used and EBHSPg have 77.8% and 22.20% of indifferent and antagonistic effect, respectively, on the strains tested. The results show that mature leaves of *P. guajava* L. have substances with antimicrobial activity, are able to positively modulate the activity of ampicillin on *P. aeruginosa* and *S. cholerae-suis* and may replace the use of young leaves. However, it is

necessary to do further research to determine the mechanism of action of this plant product, as well as new toxicity tests that provide the basis for the safe use of this plant by the population.

Keywords: *Psidium*; antimicrobial activity products; medicinal plants.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise da Variação
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AMP	Ampicilina
ATM	Antimicrobiano
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
C. albicans	<i>Candida albicans</i>
CFO	Cefoxitina
CIP	Ciprofloxacina
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLM	Concentração Letal Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standarda Institute</i>
DACT	Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EPM	Erro Padrão da Média
EBHSPg	Extrato Bruto Hidroalcoólico Seco de folhas de <i>Psidium guajava</i> L.
HI_{EBHSPg-ATM}	Halo de inibição determinado pela associação do Extrato Bruto Hidroalcoólico Seco de folhas de <i>Psidium guajava</i> L. com o antimicrobiano
HI_{ATM}	Halo de inibição determinado pelo antimicrobiano
FFOE	Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem
GEN	Gentamicina
HI	Halo de inibição

LabMicro	Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>S. cholerae-suis</i>	<i>Salmonella cholerae-suis</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
UFC	Universidade Federal do Ceará

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Planta da espécie <i>Psidium guajava</i> L. cultivada no Horto de Plantas Medicinais Prof. Francisco José de Abreu Matos da Universidade Federal do Ceará.	29
Figura 2	- Etapas para obtenção das concentrações de trabalho do EBHSPg para o teste de Potencial Antimicrobiano.	32
Figura 3	- Etapas para obtenção das concentrações de trabalho do EBHSPg para o teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM).	32
Figura 4	- Fluxograma do método Difusão em Ágar para determinação do potencial antimicrobiano do EBHSPg.	34
Figura 5	- Fluxograma do método da microdiluição em caldo de cultura para determinação da CIM (CLSI, 2003).	36
Figura 6	- Fluxograma do método da contagem para determinação da CLM (BARON; PETERSON; FINEGOLD, 1994).	37
Figura 7	- Teste para flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas.	39
Figura 8	- Teste para taninos.	40
Figura 9	- Teste para saponinas.	40
Figura 10	- Teste de Lieberman-Burchard (esteróides e triterpenóides).	40

Figura 11 - Potencial antimicrobiano do EBHSPg sobre a cepa de *S.aureus* ATCC 6538P. 42

Figura 12 - Potencial antimicrobiano do EBHSPg sobre a cepa de *S. cholerea-suis* ATCC 10708. 43

Figura 13 - Potencial antimicrobiano do EBHSPg sobre a cepa de *P. aeruginosa* ATCC 9027. 44

Figura 14 - Potencial antimicrobiano do EBHSPg sobre a cepa de *E.coli* ATCC 10536. 45

Figura 15 - Microplaca para determinação da CIM de EBHSPg para cepa *Salmonela cholerae-suis* ATCC 10708. 47

Figura 16 - Microplaca para determinação da CIM de EBHSPg para cepa *P. aeruginosa* ATCC 9027. 47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	-	Análise fitoquímica do EBHSPg de folhas de <i>P. guajava</i> L.	39
Tabela 2	-	Potencial antimicrobiano do EBHSPg sobre cepas-padrão determinado pela técnica de difusão em ágar (CLSI, 2003).	41
Tabela 3	-	CIM e CLM do EBHSPg sobre cepas padrão, determinada pela técnica da microdiluição em caldo (CLSI, 2003) e pela técnica da microgota (ROMEIRO, 2007).	46
Tabela 4	-	Efeito modulador do EBHSPg na atividade antibacteriana de antibióticos de uso clínico sobre cepas padrão.	48

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1	Plantas medicinais	20
2.2	Antimicrobianos e resistência bacteriana	21
2.3	Atividade antimicrobiana de plantas medicinais	22
2.4	Extratos vegetais	24
2.5	<i>Psidium guajava</i> L.	25
3	OBJETIVOS	28
3.1	Objetivo Geral	28
3.2	Objetivos Específicos	28
4	MATERIAIS E MÉTODO	29
4.1	Material botânico	29
4.2	Obtenção do EBHSPg	30
4.3	Análise fitoquímica do EBHSPg	30
4.3.1	<i>Teste para flavonóides</i>	30
4.3.2	<i>Teste para taninos</i>	30
4.3.3	<i>Teste para alcalóides</i>	30
4.3.4	<i>Teste para saponinas</i>	31
4.3.5	<i>Teste para heterosides digitálicos</i>	31
4.3.6	<i>Teste para antocianinas</i>	31
4.3.7	<i>Teste de Lieberman-Burchard (esteróides e triterpenóides)</i>	31
4.4	Preparação das diluições seriadas do EBHSPg	32
4.5	Determinação da atividade antimicrobiana do extrato bruto hidroalcoólico seco de folhas maduras frescas de <i>Psidium guajava</i> L. (EBHSPg)	33
4.5.1	<i>Cepas microbianas</i>	33
4.5.2	<i>Determinação do potencial antimicrobiano</i>	33
4.5.3	<i>Determinação da Concentração Inibitória Mínima – CIM</i>	35
4.5.4	<i>Determinação da Concentração Letal Mínima – CLM</i>	36
4.5.5	<i>Estudo do efeito modulador do EBHSPg na atividade de antibióticos de uso clínico</i>	38

4.6	Análise Estatística	38
5.	RESULTADOS	39
5.1	Análise fitoquímica do EBHSPg	39
5.2	Determinação do potencial antimicrobiano do EBHSPg	41
5.2.1	<i>Determinação da atividade antimicrobiana do EBHSPg pelo método de difusão em Agar</i>	41
5.2.2	<i>Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Letal Mínima (CLM)</i>	46
5.2.3	<i>Estudo do efeito modulador do EBHSPg na atividade de antibióticos de uso clínico</i>	48
6.	DISCUSSÃO	50
7.	CONCLUSÃO	56
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

1 INTRODUÇÃO

O uso popular de plantas medicinais é praticado desde os primórdios da civilização, sendo fundamentado no acúmulo de informações repassadas oralmente através de sucessivas gerações (FRANCO; BARROS, 2006). Atualmente, as plantas medicinais são utilizadas popularmente, como um método alternativo para o tratamento de diversas enfermidades, uma vez que, em muitas comunidades, representam um recurso mais acessível em relação aos medicamentos alopatônicos (BEVILACQUA, 2010).

O Brasil é o país com a maior biodiversidade do planeta, em torno de 15 a 20% do total mundial, principalmente em se tratando de plantas medicinais, que são matérias-primas para a fabricação de fitoterápicos, dentre outros medicamentos. Além disso, possui uma rica diversidade étnica e cultural e detém um vasto conhecimento tradicional relacionado ao uso de plantas medicinais, possuindo potencial necessário para o desenvolvimento de pesquisas, o que garante avanços no tratamento de muitas doenças (BRASIL, 2006).

O uso de plantas com efeito antimicrobiano tem ganhado destaque, pois muitos microrganismos desenvolveram resistência aos antibióticos tradicionais (COWAN, 1999). Através de diversos mecanismos, o microrganismo pode resistir total ou parcialmente à ação de um ou mais antimicrobianos pertencentes à mesma ou a diferentes classes terapêuticas, essa resistência pode ser natural ou adquirida, determinada geralmente por pressão seletiva ou uso incorreto dos antibióticos (OTAÍZA O'R, 2002).

Nesse contexto, a goiabeira vermelha (*Psidium guajava* L.) pode ser citada como uma planta medicinal amplamente usada, tanto no tratamento de doenças infecciosas, como as infecções do trato digestivo, além de tratar problemas respiratórios, diabetes, hipertensão e cárie. Também é utilizada como analgésico, antipirético, anti-inflamatório, antisséptico e cicatrizante. Muitas partes da planta podem ser utilizadas na medicina popular, como as folhas, a casca, a raiz e as flores, na forma de chás (preparados por infusão, no caso das folhas, ou decocção, no caso das cascas), pasta, extrato, ou colocadas aquecidas diretamente sobre a pele (ABDELRAHIM *et al.*, 2002; GUTIÉRREZ, MITCHELL e SOLIS, 2008).

Segundo Dutta e Das (2000), a tintura da casca mostrou atividade fungicida em diferentes concentrações, entretanto, para a cepa *Candida albicans*, foi encontrada somente atividade fungistática (GUTIÉRREZ, MITCHELL e SOLIS, 2008). Extrato etanólico

da casca do fruto maduro apresentou atividade contra *Streptococcus mutans* e *Escherichia coli* (NEIRA e RAMIREZ, 2005).

Chah *et al.* (2006) afirmaram que extratos aquoso e alcoólico de folhas e de raízes de *Psidium guajava* L. possuem efeito inibitório do crescimento de *Staphylococcus aureu*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Proteus spp.*, *Shigella spp.* e *Escherichia coli*. Biswas *et al.* (2013) constataram que folhas de *Psidium guajava* L. possuem substâncias com atividade antimicrobiana, como taninos, flavonóides, terpenóides e saponinas. Os extratos estudados por eles inibiram o crescimento de *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*.

A espécie *Psidium guajava* L. apresenta grande utilidade na medicina popular, podendo ser utilizar praticamente todas as partes da planta no tratamento de várias doenças. Em se tratando do uso das folhas para tratar diarréia e infecção intestinal, estudos (VIEIRA *et al.*, 2001; MATOS, 2007; IHA *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2012) relatam o uso dos brotos (folhas jovens) para o preparo de chás, já as folhas maduras e as secas são menos citadas na literatura.

Como os brotos estão em pequena quantidade na planta, pesquisar o potencial antimicrobiano das folhas maduras assume grande importância, pois estas são encontradas em maior quantidade nas árvores dessa espécie e seu uso poderia preservar o vegetal, além de ser de mais fácil acesso a população.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Plantas medicinais,

Em muitas comunidades e grupos étnicos, o conhecimento popular sobre plantas medicinais representa, geralmente, o único meio de se obter cura para diversas doenças. Esse conhecimento é obtido de forma empírica e repassado de geração em geração. Atualmente, nas regiões mais pobres do Brasil, ou, até mesmo, nas grandes capitais, as plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, ou são cultivadas em várias residências (TEIXEIRA, 2009).

A biodiversidade dos vegetais constitui a principal fonte de moléculas para a produção de uma gama de produtos economicamente importantes, incluindo modelos para a síntese de um grande número de fármacos (COWAN, 1999). Estudos relacionados com plantas na medicina alternativa têm merecido muita atenção, devido aos grandes avanços que fornecem às ciências da saúde (CARNEIRO *et al.*, 2014).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), planta medicinal é toda planta, ou partes dela, que contenham as substâncias, ou classes de substâncias responsáveis pela ação terapêutica (BRASIL, 2010). O uso de substâncias derivadas de plantas tem se destacado, tanto como agentes terapêuticos, quanto como matéria-prima para a síntese de novos medicamentos (ASSIS; MORELLI-AMARAL; PIMENTA, 2015). Aproximadamente 40% dos medicamentos atualmente disponíveis foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de fontes naturais, em sua maioria de plantas (WHO, 2011).

O principal uso terapêutico de plantas medicinais é no tratamento de doenças respiratórias, seguido das inflamações em geral e das variadas formas de doenças intestinais (MATOS, 2002). Muitas plantas medicinais de uso popular já possuem efetividade terapêutica comprovada e características químicas e farmacológicas que justificam o seu uso disseminado em comunidades. Dessa forma, esse tipo de cultura medicinal é fonte de inspiração para a ocorrência de novas pesquisas de produtos terapêuticos de origem vegetal (TEIXEIRA, 2009).

Segundo dados da OMS, em países em desenvolvimento, como Itália, Canadá, Alemanha e França, o uso de produtos da medicina tradicional, incluindo as plantas

medicinais, é praticado por 70 a 90% da população. A OMS também afirma que os produtos naturais são fontes de grande variedade de substâncias com atividade biológica e medicinal. Estima-se que pelo menos 25% de todos os medicamentos são derivados, direta ou indiretamente, de plantas medicinais. No caso de algumas classes de medicamentos, como antimicrobianos ou antitumorais, a percentagem pode ser em torno de 60%. Por esses e outros fatores, a investigação farmacológica de plantas deve ser praticada como uma prioridade (WHO, 2011).

3.2 Antimicrobianos e resistência bacteriana

A ação antimicrobiana é fundamentada na toxicidade seletiva, ou seja, na capacidade seletiva de inibição do crescimento do microrganismo sem causar danos ao hospedeiro. Como exemplo, pode-se citar a penicilina, que impede a síntese de peptideoglicano, inibindo o crescimento das células bacterianas sem afetar as células humanas (LEVINSON e JAWETZ, 2014).

O uso de antibióticos e de quimioterápicos permitiu o controle e a cura de muitas doenças infecciosas, representando um grande passo para a promoção da saúde humana. Porém, a partir da década de 70, o uso indiscriminado dos antibióticos fez surgir cepas resistentes aos tratamentos existentes na época, principalmente em se tratando de ambientes hospitalares (TEIXEIRA, 2009). A resistência é um mecanismo de defesa dos microrganismos que pode acontecer naturalmente, em presença de substâncias tóxicas, através de mutações genéticas que alterem a função ou expressão de genes próprios, ou pode ser adquirida através de troca de genes com outro organismo, garantindo uma maior adaptação ao meio ambiente hostil (FERNANDEZ *et al.*, 2011).

Em virtude da elevada utilização de antibióticos, tanto na clínica médica, quanto na agricultura e na pecuária, tem sido observada uma grande pressão seletiva ambiental para o desenvolvimento de cepas resistentes aos antibióticos mais frequentemente usados. Por isso, a resistência bacteriana proveniente do cenário comunitário vem tomando espaço em vários estudos ambientais, não estando mais ligada apenas ao ambiente hospitalar, como se acreditava no passado (ANDERSSON; HUGHES, 2010).

A resistência aos antimicrobianos, nos dias atuais, alcançou uma escala e distribuição tamanhas que levou a Organização Mundial da Saúde (OMS) a reconhecer tal fato como uma crise de saúde pública global (OMS, 2012). Segundo Batista (2014), um conjunto integrado de mecanismos de resistência protege as bactérias contra a ação dos antimicrobianos, dentre eles: alteração da permeabilidade celular, bomba de efluxo, mecanismos enzimáticos e alteração do sítio de ação.

A grande preocupação com relação ao desenvolvimento de resistência dos microrganismos patogênicos aos antibióticos é a redução da eficácia terapêutica dos tratamentos empíricos, resultando em um problema de elevada significância clínica (ANDERSSON; HUGHES, 2010). Desse modo, há uma diminuição considerável das opções terapêuticas, o que torna a cura demorada, dispendiosa, ou, muitas vezes, inatingível (COSTELLOE *et al.*, 2010).

Como as bactérias desenvolveram diversas formas de resistência, a ciência passou a pesquisar novos meios de combatê-las, sendo o uso de plantas medicinais uma das alternativas que tem ganhado destaque nos anos mais recentes (SIMÕES *et al.*, 2009). Tais estudos possibilitam a descoberta de plantas que apresentem substâncias com esta propriedade ou que potencializem o efeito terapêutico em associação aos antibióticos (ZAGO *et al.*, 2009).

Por isso, as indústrias de medicamentos têm buscado encontrar substâncias novas, ou sintetizá-las em laboratório e utilizam as plantas como fonte de pesquisa na busca de novas terapias para combater diversos tipos de infecções, principalmente no Brasil, país tão rico em biodiversidade. Desse modo, unindo o conhecimento da medicina tradicional aos modernos meios de pesquisa, pode-se encontrar e comprovar a existência de substâncias naturais com potencial efeito antimicrobiano.

3.3 Atividade antimicrobiana de plantas medicinais

Nos últimos anos, o conhecimento sobre o potencial terapêutico de plantas com atividade antimicrobiana tem despertado o interesse científico, o que tem incentivado os pesquisadores a buscar novas formas de controlar e tratar diversas doenças (FERREIRA *et al.*, 2011; BISPO, FRANCISCO, SCHIMMITT, 2007). Os desafios no tratamento de doenças infecciosas vêm crescendo de forma significativa, tendo em vista que bactérias resistentes a

múltiplos antimicrobianos representam um entrave para a cura de doenças infecciosas, gerando a necessidade de se buscar novas fontes alternativas com propriedades antibióticas que sejam mais eficientes no combate a diversas infecções, principalmente as de origem bacteriana (SILVA *et al.*, 2007).

Uma vez que as plantas medicinais produzem uma variedade de substâncias com propriedades antimicrobianas, é esperado que programas de triagem possam descobrir compostos candidatos para o desenvolvimento de novos antibióticos (AHMAD e BEG, 2001). Realizar ensaios *in vitro* com plantas medicinais é muito importante para direcionar estudos quanto a investigação de fontes que apresentem atividade antimicrobiana em potencial (MAHADY, 2005; NEWMAN e CRAGG, 2007).

A literatura relata que o uso de diferentes compostos naturais associados ou não a antibióticos sintéticos podem ser eficazes no tratamento de processos infecciosos, causados por agentes patogênicos de diversas espécies. Dessa forma, as plantas medicinais também podem ser utilizadas em associação com os antibióticos, produzindo ação sinérgica sobre linhagens microbianas resistentes, o que representa uma estratégia para o tratamento de infecções, tornando possível o uso de agentes antimicrobianos que seriam ineficazes se utilizados isoladamente (HEMAISWARYA, KRUTHIVENTI e DOBLE, 2008; CHOU, 2010; TEIXEIRA, 2009).

Os principais produtos obtidos a partir da matéria prima ativa vegetal são os óleos essenciais e extratos vegetais. A utilização destes com conhecida atividade antimicrobiana tem grande significado nos tratamentos terapêuticos. É conhecido que muitas espécies vegetais possuem substâncias ativas que apresentam atividade antimicrobiana contra um grande número de microrganismos, incluindo espécies resistentes a antibióticos e antifúngicos (NASCIMENTO *et al.*, 2000).

Nesse contexto, a planta de espécie *Psidium guajava* L. se destaca por seu grande uso popular para tratar doenças de origem infecciosa, o que tem incentivado a realização de pesquisas para que se faça sua caracterização fitoquímica, relacionando as substâncias encontradas com a comprovação de sua atividade antimicrobiana, o que permite que população use essa planta como alternativa para tratar infecções.

3.4 Extratos vegetais

Atualmente, é frequente a ocorrência de estudos desenvolvidos e direcionados à descoberta de novos agentes antimicrobianos provenientes de extratos vegetais e outros produtos naturais, com o propósito de descobrir compostos com atividade comparada à dos tradicionalmente utilizados, porém, com menor toxicidade, mais eficazes contra a resistência de micro-organismos patogênicos e com menor impacto ambiental (BONA, *et al.*, 2014).

A atividade biológica das substâncias de origem vegetal pode se manifestar, por exemplo, mediante a propriedades herbicidas, inseticidas, fungicidas ou farmacológicas. Da mesma maneira, enquadra-se a atividade alelopática testada em muitos extratos vegetais. Esse tipo de atividade biológica está relacionada com a capacidade de um ser vivo liberar substâncias químicas, denominadas aleloquímicos, que atuam de forma favorável ou desfavorável sobre outro ser vivo. A liberação dessas substâncias pode ocorrer pelas diversas partes da planta ou por intermédio da decomposição de folhas e caules e exsudação direta no solo pelas raízes (TERRONES *et al.*, 2007).

Diversos estudos são feitos, avaliando-se a atividade antimicrobiana de extratos provenientes de diferentes espécies de plantas e obtém uma resposta positiva para o efeito buscado. Michelin *et al.* (2005) avaliaram a atividade antimicrobiana de *Artemisia absinthium* L. (losna), *Mentha pulegium* L. (poejo), *Punica granatum* L. (romã), *Xanthosema violaceum* S. (taioba) e *Syzygium cuminii* L. (jambolão). Extratos com atividade mais expressiva foram os de *X.violaceum*, *P.granatum* e *S.cuminii* que inibiram, respectivamente, 53,3, 40,0 e 40,0% dos microrganismos testados. Verificou-se que *X. violaceum* e *S. cuminii* nas concentrações de 50 e 60 mg/mL, respectivamente, inibiram tanto bactérias Gram positivo quanto Gram negativo, porém *P. granatum*, na concentração de 100mg/mL inibiu apenas bactérias Gram negativo.

Biswas *et al.* (2013) estudaram o potencial antimicrobiano de extratos de folhas de *Psidium guajava* L., extraídos de quatro tipos de solventes contendo diferentes polaridades: hexano, metanol, etanol e água contra cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*. Os testes de sensibilidade a antimicrobianos foram feitos pelo método de disco-difusão. Desses extratos, o metanólico e etanólico mostraram atividade contra *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*, mas nenhuma

atividade contra as bactérias Gram negativo. Tal resistência das bactérias Gram negativo poderia ser atribuída à estrutura da parede celular, que tem uma efetiva barreira de permeabilidade, composta por uma membrana externa de lipopolissacarídeos, que pode ter restringido a penetração do extrato na bactéria. Por isso, muitas vezes as bactérias Gram negativo apresentam mais resistências aos efeitos antimicrobianos de extratos vegetais do que bactérias Gram positivo.

Porém, segundo Oliveira (2012), o extrato aquoso extraído do broto central, conhecido como olho da goiabeira, tem conhecida atividade contra agentes responsáveis por diarréias de origem bacteriana: *Serratia*, *Salmonella* e *Staphylococcus*. Tal atividade é mais eficiente quando se trata de brotos provenientes da goiabeira vermelha, variedade estudada no presente trabalho. Chah *et al.* (2006) afirmaram que extratos aquoso e alcoólico de folhas e de raízes de *Psidium guajava* L. possuem efeito inibitório do crescimento de *Staphylococcus aureu*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Proteus spp.*, *Shigella spp.* e *Escherichia coli*, ou seja, é eficaz contra vários agentes causadores de infecção intestinal.

2.5 *Psidium guajava* L.

O gênero *Psidium* pertende a família Myrtaceae, que é composta de 3800 a 5800 espécies, distribuídas em cerca de 132 gêneros (GOVAERTS *et al.*, 2008). *Psidium guajava* L. é uma espécie presente em todas as regiões do Brasil (SOBRAL *et al.*, 2013). No Brasil, essa planta é popularmente conhecida como Goiabeira, Goiabeira-vermelha, Goiabeira-branca, Araçá- goiaba, Goiaba, Araçá-das-almas, Araçá-guaçu, Araçá-mirim, Araçaíba, Araçauaçu, Goiaba-maçã. Na Espanha, é chamada de *Guayaba* ou *Guayabo*; nos Estados Unidos, *Guava*. Na França, chama-se *Guave*, *Goyave* ou *Goyavier*; no Japão, *Banjiro*. É conhecida como *Guave*, *Guavenbaum*, *Guayave* na Alemanha. É chamada de *Goiaba* ou *Goiabeiro*, em Portugal (MATOS, 2002; KILLION, 2000).

A espécie *Psidium guajava* L. é uma arvoreta frutífera de copa aberta de até 7 metros de altura, com folhas opostas, oblongas, subcoriáceas e aromáticas. Os caules jovens são quadrangulados levemente ou fortemente alados, muitas vezes sulcados. As flores são brancas, solitárias, ou em grupos de 2 a 3 na região axial das folhas. Os frutos são do tipo baga, com polpa doce, levemente aromática e de coloração rosa, amarela ou branca, e tem

numerosas sementes (MATOS, 2002; LANDRUM *et al.*, 1995). A dispersão é feita por aves, morcegos, lagartos e macacos. A espécie floresce entre setembro e novembro e frutifica entre dezembro e março. Essa frutificação ocorre quando a planta atinge 12 a 24 meses de idade (CAMPOS, 2010).

Seu fruto é conhecido como goiaba, uma fruta tropical com excelente qualidade, alto valor nutritivo, boas propriedades organolépticas, possui elevado rendimento por hectare e polpa de grande qualidade industrial. O Brasil é o terceiro maior produtor nacional no ranking mundial de produção, pois a goiabeira consegue desenvolver-se em praticamente todos os tipos de solos e variados tipos climáticos, estando presente em grande parte do território nacional (MANICA *et al.*, 2001).

Um levantamento da família *Myrtaceae* realizado em 2008 revelou registros de aproximadamente 92 espécies do gênero *Psidium*, todas nativas da América (GOVAERTS *et al.*, 2008). As espécies são amplamente distribuídas, ocorrendo nos biomas da caatinga, cerrado, campos rupestres, floresta amazônica, atlântica, deciduais, residuais, dentre outros, e sujeitas a pressões ambientais, que geram plasticidade fenotípica, dificultando a identificação e a delimitação de suas espécies (COSTA, 2009).

O gênero *Psidium* L. é neotropical em sua distribuição geográfica, ocorrendo desde o México, Caribe, Uruguai até a província de Buenos Aires, na Argentina, até as Ilhas de Galápagos, Índias Ocidentais (Caribe) e Revillagigedo. No Brasil, ocorre desde o Amazonas até o Rio Grande do Sul (ROTMAN, 1976; LANDRUM & KAWASAKI, 1997; SOARES-SILVA & PROENÇA, 2008).

A goiabeira é uma das plantas de clima tropical que tem apresentado considerável aumento das áreas de plantio, sendo que a maioria dos frutos produzidos são destinados a industrialização, para produção de diversos produtos (NATALE *et al.*, 2009). No ano de 2011, com uma área plantada de 15.956 há, o Brasil obteve uma produção de 342.528 toneladas, com um valor de aproximadamente 276.333 milhões de reais, destacando-se as regiões Nordeste e Sudeste, que contribuíram com 88% da produção nacional (IBGE, 2013). Basicamente, existem duas variedades de frutos: goiaba branca, de casca esverdeada e interior amarelo-esverdeado pálido, e uma denominada goiaba vermelha, de casca amarela e interior rosado (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Essa planta quantidades regulares de ácidos, açúcares e pectinas. Seus principais constituintes são taninos, flavonóides, óleos essenciais, saponinas, alcoóis sesquiterpenóides. As partes utilizadas do vegetal são os frutos, a casca, os brotos, as folhas e raízes. Apresenta atividade antimicrobiana, antitussígena, antimutagênica, hipoglicêmica, dentre outras. Estudos etnofarmacológicos mostram grande aplicação na medicina popular para tratamento diversos, como cólicas, colites, diarréia, disenteria, malária, alergias, problemas cardiovasculares, diabetes, câncer, doenças no fígado e dores musculares (VENDRUSCOLO *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2007; GUTIÉRREZ *et al.*, 2008).

Diante do que foi dito, percebe-se que a *Psidium guajava* L. apresenta grande utilidade na medicina popular. Porém, estudos citam mais frequentemente o uso dos brotos (folhas jovens) para o preparo de chás, apesar de eles estarem em menor quantidade na planta, já as folhas maduras são menos citadas. O estudo das folhas maduras é importante para a comprovação de que possuem substâncias ativas com atividade antimicrobiana, podendo ser uma alternativa ao uso dos brotos. As folhas maduras estão em maior quantidade na planta e, por isso, são de mais fácil acesso a população, o que coloca a goiabeira como uma opção de tratamento eficiente, eficaz e a disponível para a comunidade.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antimicrobiana e moduladora do extrato hidroalcoólico das folhas maduras de *Psidium guajava L.* (EBHSPg).

3.2 Objetivos Específicos

- Realizar a caracterização fitoquímica do EBHSPg;
- Avaliar o potencial antimicrobiano do EBHSPg, *in vitro*, sobre cepas de referência: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Salmonella cholerae-suis* subespécie *cholerae-suis* ATCC 10708 e *Candida albicans* ATCC 10231;
- Determinar as Concentrações Inibitórias Mínima (CIM) e a Concentração Letal Mínima (CLM), *in vitro*, do EBHSPg sobre as cepas microbianas;
- Avaliar o efeito modulador do EBHSPg na atividade de antibióticos de uso clínico.

4 MATERIAIS E MÉTODO

4.1 Material botânico

As amostras das folhas maduras frescas da espécie *Psidium guajava* L., goiabeira vermelha (Figura 1), foram coletadas do Horto de Plantas Medicinais Prof. Francisco José de Abreu Matos da Universidade Federal do Ceará e utilizadas para obtenção do EBHSPg a 10%. A identificação botânica da espécie foi realizada no Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará (UFC) e a exsicata encontra-se depositada no Herbário Prisco Bezerra (UFC) sob o número 57888.

Figura 1 – Planta da espécie *Psidium guajava* L. cultivada no Horto de Plantas Medicinais Prof. Francisco José de Abreu Matos da Universidade Federal do Ceará.



Fonte: elaborada pelo autor (2015).

4.2 Obtenção do EBHSPg

O EBHSPg foi preparado a partir de folhas frescas maduras de *Psidium guajava L.*. As folhas maduras foram colhidas, secas e estabilizadas em estufa de ar circulante a 45 °C. Em seguida, o material foi triturado no moinho de facas. O pó resultante foi extraído através de maceração, utilizando etanol a 70% durante três dias e água destilada estéril. O material líquido resultante foi esterilizado por filtração em membrana filtrante de porosidade 0,22 µm e concentrado em estufa de secagem a 30°C, durante três dias. O rendimento da extração, calculado pela formula "massa de extrato seco/peso seco x 100" (p/p%), foi de 16,70%.

4.3 Análise fitoquímica do EBHSPg

Os testes fitoquímicos foram realizados para o extrato dissolvido em 100 mL de solução hidrofílica (etanol com 30% de água). Separando-se em porções de 3 mL em tubos de ensaio e duas porções de 10 mL em dois bêqueres deixados em banho-maria até secura e mantidos em dessecador até a ocasião de serem usados (MATOS, 1998).

4.3.1 Teste para flavonóides

Foram adicionados, ao tubo contendo o extrato, alguns centigramas de magnésio em fita e 0,5 mL de HCl concentrado e, ao fim da reação (fim da efervescência), foram observadas as possíveis mudanças na cor da mistura e comparada com a coloração da mistura do tubo contendo a droga padrão. O aparecimento de cor vermelha é indicativo da presença de flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas livres ou seus heterosídeos (MATOS, 1998).

4.3.2 Teste para taninos

Em tubos de ensaio contendo 3 mL do extrato foram adicionadas três gotas de cafeína 2% e cloreto férrico, respectivamente. A formação de precipitado com a adição de cafeína é indicativa da presença de tanino. Já para o cloreto férrico, a mudança de coloração, apresentando um precipitado escuro de cor azul indica a presença de taninos pirogálicos. Se houver o aparecimento de uma coloração verde, indica a presença de taninos catéquicos (MATOS, 1998).

4.3.3 Teste para alcalóides

Em cinco tubos de ensaio contendo o extrato obtido inicialmente foram adicionadas três gotas dos reagentes de Mayer, Bouchardat, Dragendorf, Bertrand e Hager. A formação de precipitados frente a adição desses reagentes é indicativa da presença de alcalóides (MATOS, 1998).

4.3.4 Teste para saponinas

O resíduo insolúvel, separado na operação inicial, foi redissolvido em 10 mL de água destilada e filtrado para um tubo de ensaio. A solução foi agitada fortemente por 3 minutos e observou-se a formação de espuma. A formação de espuma persistente e abundante indica a presença de saponinas (MATOS, 1998).

4.3.5 Teste para heterosides digitálicos

Em um tubo de ensaio foram adicionados 2 mL da solução de ácido 3,5 – dinitrobenzóico a 2 mL do extrato. Em seguida, adicionou-se lentamente 2 mL de KOH 2N. O aparecimento de uma coloração castanho avermelhada indica a presença de princípios cardioativos (MATOS, 1998).

4.3.6 Teste para antocianinas

Acidifica-se um dos tubos contendo 2 mL do extrato até pH 3 e depois verifica-se a ocorrência de coloração vermelha como indicativo da presença de antocianinas (MATOS, 1998).

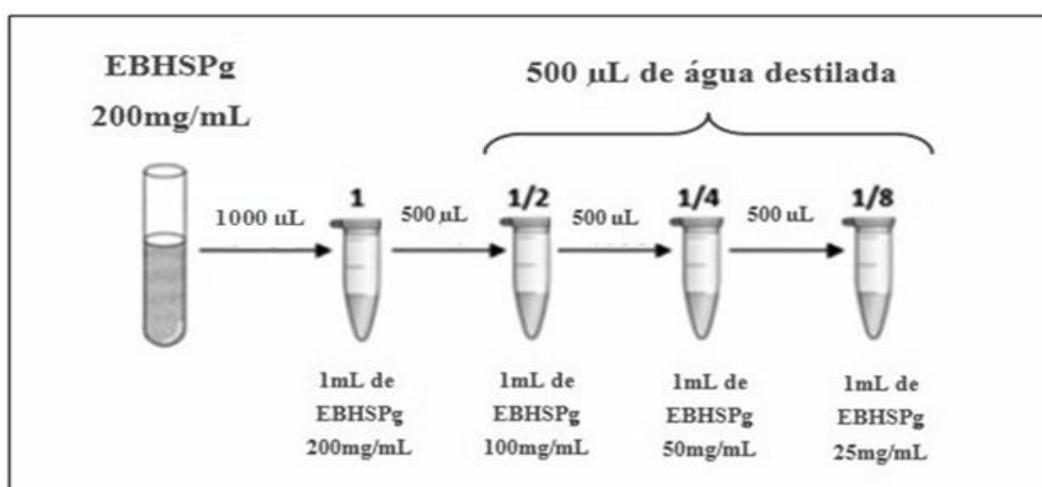
4.3.7 Teste de Lieberman-Burchard (esteróides e triterpenóides)

Foi extraído o resíduo seco de um dos béqueres três vezes com 3 mL de clorofórmio, tendo o cuidado de triturar bem o resíduo com o solvente. Filtrada a solução clorofórmica em um pequeno funil fechado com algodão, coberta com Na₂SO₄ anidrido, para um tubo de ensaio seco. Foi adicionado 1 mL de anidrido acético, agitado e acrescentado 3 gotas de H₂SO₄ concentrado cuidadosamente. Após agitação, observou-se a reação. O aparecimento da coloração azul seguida de verde permanente é indicativo da presença de esteróides livres, enquanto que o aparecimento da coloração entre parda a vermelha indica a presença de triterpenóides (MATOS, 1998).

4.4 Preparação das concentrações seriadas do EBHSPg

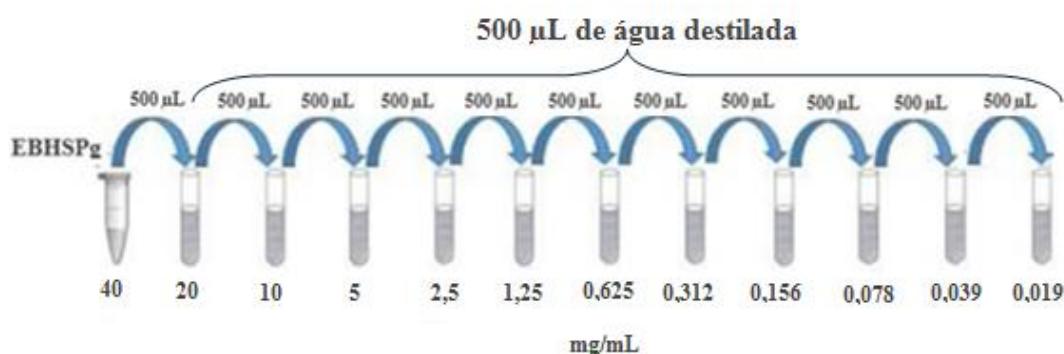
Concentrações seriadas (200mg/mL a 25 mg/mL) foram obtidas, em água destilada estéril, a partir de uma concentração inicial de 200 mg/mL de EBHSPg (figura 2) e foram utilizadas para o teste do potencial antimicrobiano do extrato. Os testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM) foram feitos com o extrato nas diluições de 40 mg/mL a 0,019 mg/mL (figura 3).

Figura 2 – Etapas para obtenção das concentrações de trabalho do EBHSPg para o teste de Potencial Antimicrobiano



Fonte: elaborada pelo autor (2015).

Figura 3 - Etapas para obtenção das concentrações de trabalho do EBHSPg para o teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM)



Cada tubo contém 500 μL de água destilada estéril.

Fonte: elaborada pelo autor (2015).

4.5 Determinação da atividade antimicrobiana EBHSPg

Os procedimentos experimentais foram executados no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada (LabMicro) do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará (DACT-FFOE-UFC).

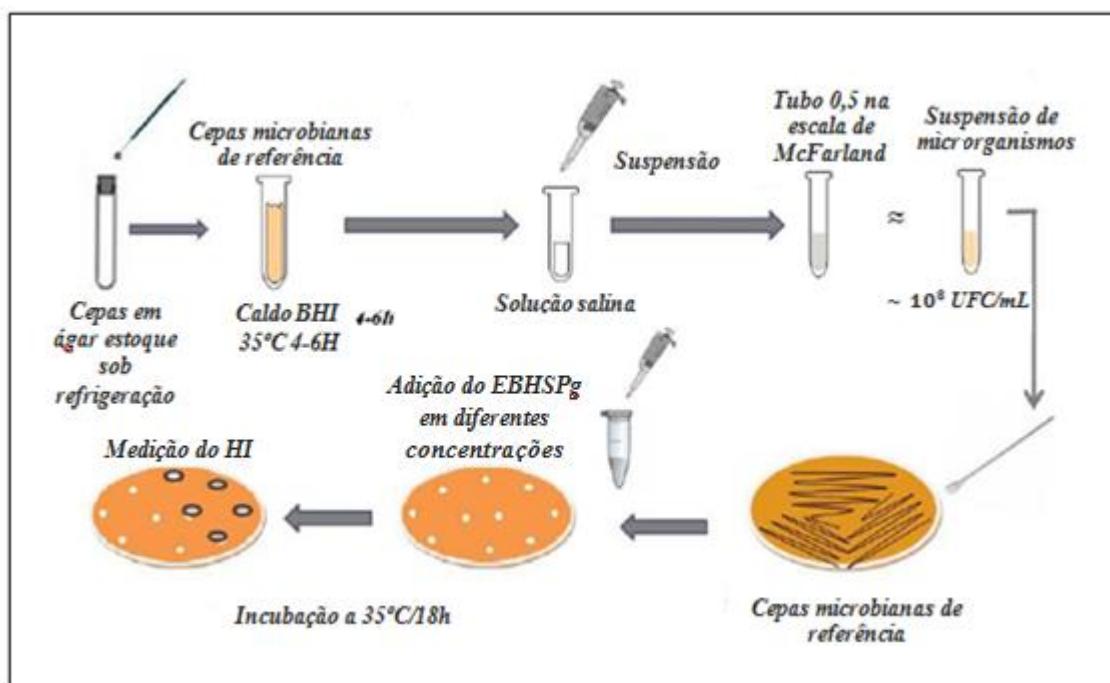
4.5.1 Cepas microbianas

Para os ensaios de atividade antimicrobiana foram utilizadas cinco cepas microbianas-padrão: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P (sensível a oxacilina), *Escherichia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Salmonella cholerae-suis* subespécie *cholerae-suis* ATCC 10708 e *Candida albicans* ATCC 10231, pertencentes a coleção de culturas do LabMicro. Todas as cepas encontram-se estocadas em Agar estoque sob refrigeração adequada de forma a conservarem inalteradas todas as suas características bioquímicas e perfil de sensibilidade a antimicrobianos. Periodicamente, são realizados repiques para meios de cultura esterilizados, e a pureza de cada cultura confirmada por microscopia, provas bioquímicas e antibiogramas.

4.5.2 Determinação do potencial antimicrobiano

A determinação do potencial antimicrobiano dos extratos foi realizada segundo o método de difusão em Agar (Norma M2-A8, Vol. 23 N° 1 do *Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI*, 2003), modificado. Foi realizada uma adaptação desta técnica, pois ao invés de utilizar os discos de papel impregnados com as amostras, foram confeccionados poços para a aplicação das diferentes concentrações dos extratos (figura 4).

Figura 4- Fluxograma do método Difusão em Ágar para determinação do potencial antimicrobiano do EBHSPg



Fonte: adaptado de TEIXEIRA (2009).

Culturas microbianas puras foram repicadas para caldo de infusão de cérebro e coração (BHI, Merck) e incubadas a 35°C *overnight*. Após essa etapa, as culturas tiveram sua densidade celular ajustada em solução salina 0,85% estéril de modo a se obter uma turbidez equivalente a do tubo 0,5 da escala de McFarland, resultando em uma suspensão microbiana contendo aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Para a realização desta etapa, foi utilizado um cartão de fundo branco com linhas contrastantes pretas ao fundo, auxiliando no ajuste da suspensão microbiana, a olho nu, para a turbidez da escala de McFarland.

Com o auxílio de *swabs* estéreis, as suspensões microbianas foram semeadas na superfície do ágar Mueller-Hinton (Merck), para cepas bacterianas, ou ágar Sabouraud-dextrose a 4% (Merck), para a levedura *C. albicans*.

Após cinco minutos a temperatura ambiente, foram feitos poços de 6 mm de diâmetro interno no Ágar com auxílio de um perfurador estéril. Nesses poços foram aplicados volumes de 40 μ L das diferentes concentrações (200 a 25 mg/mL) do extrato hidroalcoólico. Foram utilizados como controles: antimicrobianos comerciais (controle da inibição do crescimento microbiano) e água destilada (controle da ausência de inibição do crescimento microbiano).

Após 18h de incubação a 35°C foi verificada a formação de halos de inibição (HI) de crescimento microbiano. Os diâmetros dos halos formados foram medidos em milímetros com auxílio de um paquímetro. Os ensaios foram feitos em duplicata e os valores dos halos de inibição são as médias dos dois ensaios. A técnica de difusão em ágar foi utilizada como triagem na determinação do potencial antimicrobiano. Assim, somente as cepas que apresentaram sensibilidade ao extrato foram utilizadas nas outras etapas do estudo.

4.5.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima – CIM

As cepas que apresentaram sensibilidade ao extrato pelo método de difusão em ágar, como relatado anteriormente no item 4.5.2, foram submetidas à determinação da CIM pelo método de microdiluição em caldo de cultura (Norma M7-A6, Vol. 23 N° 2, CLSI, 2003). No presente ensaio, foram utilizadas microplacas estéreis com 96 poços de fundo redondo (figura 5). Esse método utiliza volumes reduzidos de reagentes e avalia um grande número de bactérias, fornecendo informações quantitativas indisponíveis pelo método de difusão em ágar.

Suspensões microbianas foram obtidas como descrito no item 4.5.2 e diluída 100 vezes, em meio BHI estéril, para que 10^6 UFC/mL. Uma alíquota desta suspensão foi diluída 100 vezes para a obtenção de outra contendo 10^4 UFC/mL, que foi utilizada posteriormente na determinação do tamanho do inoculo microbiano inicial.

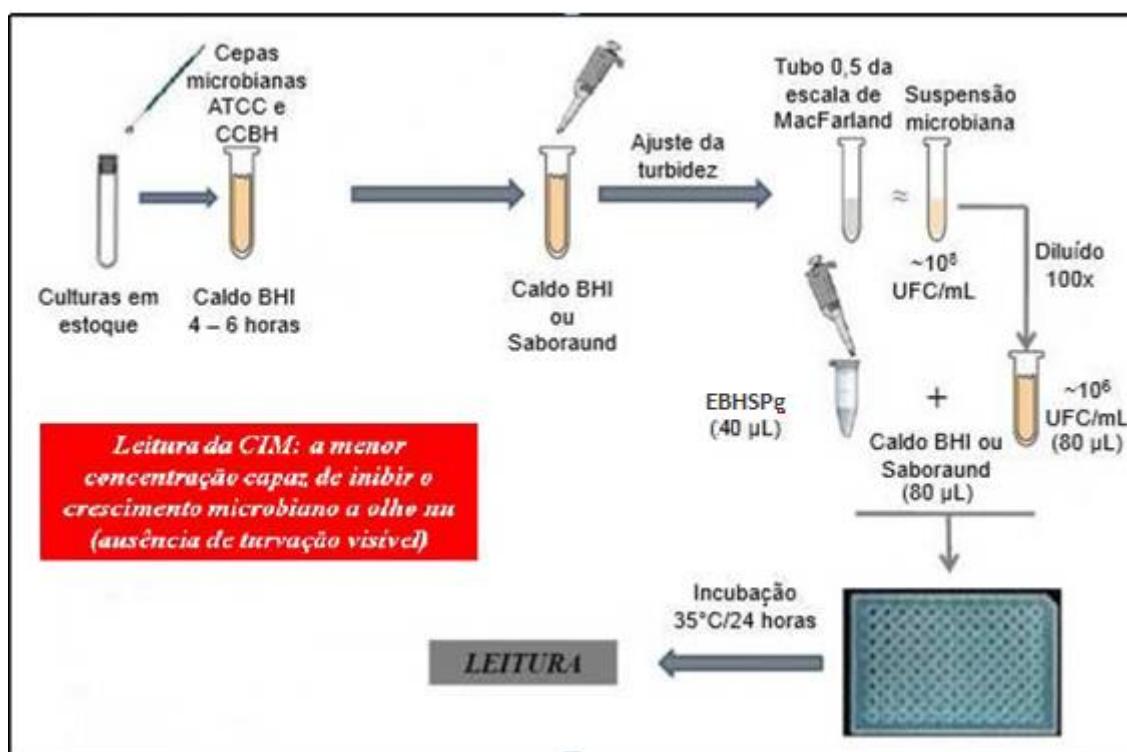
Aos poços da microplaca de microdiluição, foram adicionados 80 µL de caldo BHI, 40 µL das diferentes concentrações do EBHSPg (nas concentrações finais de 40mg/mL a 0,019 mg/mL) e 80 µL de suspensão de microrganismo. Como controles de experimento foram usados agente antimicrobiano (gentamicina 10 µg/mL para cepas bacterianas; miconazol 32µg/mL para levedura), meio de cultura, o inoculo do microrganismo e água destilada estéril.

As placas foram incubadas a 35°C por 24 horas com no máximo quatro placas em cada pilha para manter a temperatura de incubação homogênea para todas as culturas. Após esse período as leituras foram realizadas. Como a detecção visível (a “olho nu”) não foi possível devido à turvação natural apresentada pelo extrato, então utilizou-se o corante resazurina sódica para possibilitar a leitura da CIM, através da mudança de coloração de azul (ausência de crescimento microbiano) para rosa (presença de crescimento

microbiano). Dessa forma, a inibição do crescimento microbiano foi determinada por inspeção visual e por medida de absorbância a 570 nm em leitor de Elisa Bio-Tek.

A CIM foi considerada a menor concentração de extrato ou de antimicrobiano capaz de inibir completamente o crescimento microbiano, mediante inspeção a olho nú (ausência de turvação visível). As leituras de absorbância foram utilizadas para evitar erros determinados pela turvação do extrato.

Figura 5- Fluxograma do método da microdiluição em caldo de cultura para determinação da CIM (CLSI, 2003).



Fonte: adaptado de TEIXEIRA (2009).

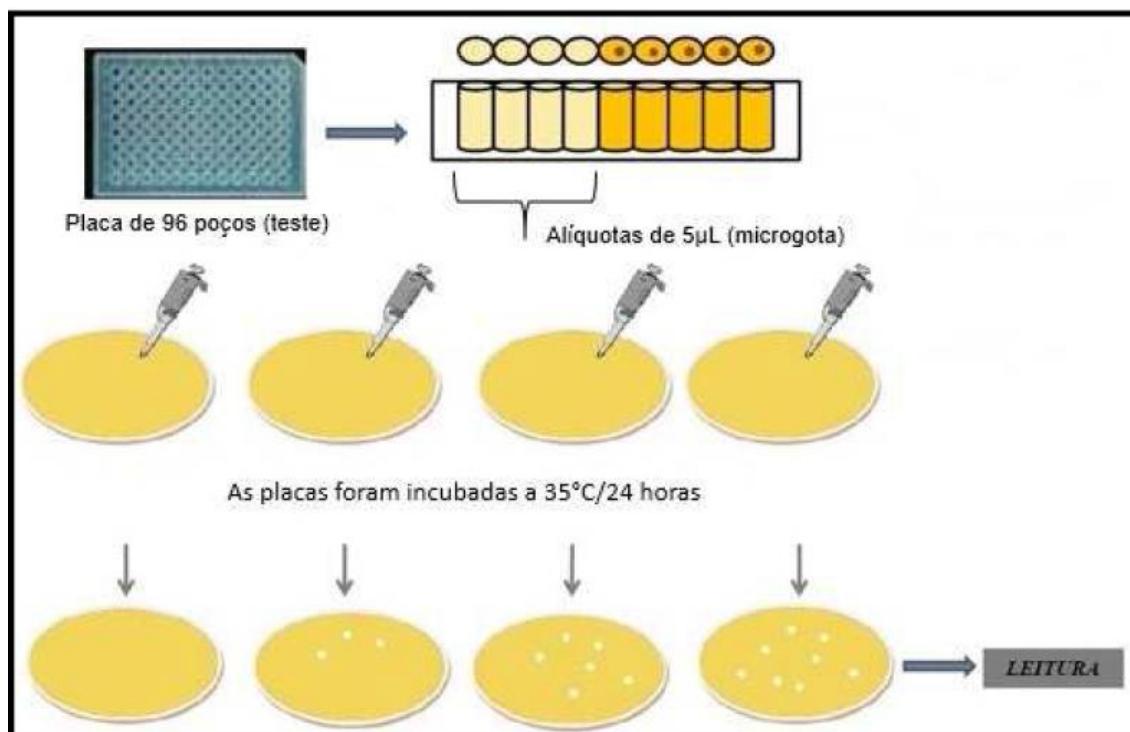
4.5.4 Determinação da Concentração Letal Mínima – CLM

A determinação da CLM foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Baron, Peterson e Finegold (1994), que está representada na figura 6. De forma asséptica, foram depositados inóculos de 5 µL obtidos a partir dos poços das microplacas de microdiluição usadas para a determinação da CIM (item 4.5.3), que não apresentaram crescimento microbiano visível, na superfície do ágar *Plate-Count*. Em seguida, as placas foram incubadas a 35°C durante 24h e foram feitas as contagens das colônias crescidas na superfície do ágar. A concentração do extrato que determinou um crescimento microbiano na

superfície do ágar < 0,1% do inoculo inicial, foi considerada a CLM, ou seja, a menor concentração do extrato capaz de determinar a morte de 99,9% das células microbianas testadas.

O tamanho do inoculo microbiano inicial foi determinado pela técnica de microgotas (ROMEIRO, 2007), a fim de confirmar se as suspensões microbianas usadas continham realmente o número de UFC/mL desejado, ou seja, aproximadamente 10^6 UFC/mL, e determinar a CLM. Para isso, foram adicionadas, assepticamente, 5 gotas contendo 5 μL , cada, de uma suspensão microbiana com aproximadamente 10^4 UFC/mL à superfície do ágar *Plate-Count* (Merck) que foi incubado a 35°C por 24h. Após esse período, as colônias crescidas na superfície do ágar foram contadas e foi calculada a média aritimética. O valor obtido foi multiplicado pelo valor da diluição, para confirmar se as suspensões microbianas usadas continham realmente o número de UFC/mL desejado, ou seja, aproximadamente 10^6 UFC/mL. Esse experimento foi realizado em duplicata e o resultado foi a média dos valores obtidos.

Figura 6- Fluxograma do método da contagem para determinação da CLM (BARON; PETERSON; FINEGOLD, 1994)



Fonte: adaptado de TEIXEIRA (2009).

4.5.5 Estudo do efeito modulador do EBHSPg na atividade de antibióticos de uso clínico

A ação moduladora do EBHSPg na atividade antimicrobiana de antibióticos de uso clínico (GEN – Gentamicina 30 μ g, CFO – Cefoxitina 30 μ g, CIP – Ciprofloxacina 5 μ g, AMP – Ampicilina 10 μ g) sobre as cepas padrão *P. aeruginosa* ATCC 9027, *Salmonella cholerae-suis* subespécie *cholerae-suis* ATCC 10708 e *S. aureus* ATCC 6538P foi determinada pelo método de disco-difusão (BAUER *et al.*, 1966), modificado (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Culturas contendo aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL foram semeadas na superfície de ágar Mueller Hinton. Discos comerciais de agentes antimicrobianos (ATM) foram aplicados na superfície do meio e a cada disco foram adicionados 20 μ L da CIM do extrato, previamente determinada. Para avaliar o efeito da combinação EBHSPg+ATM, discos de ATM, sem adição de extrato foram testados para cada cepa. Após incubação das placas a 37°C/18h, foi realizada a leitura dos diâmetros dos halos de inibição (HI) de crescimento microbiano.

Os diâmetros dos HI de crescimento microbiano determinados por cada associação EBHSPg+ATM foram comparados aos determinados pelo ATM isoladamente. Foi considerado *efeito sinérgico* quando a combinação determinou um aumento do diâmetro de HI do ATM \geq que 2mm; *efeito antagônico* quando o diâmetro do HI determinado pela combinação foi menor que o diâmetro do HI ATM isolado; e, efeito indiferente, quando a combinação determinou um aumento no diâmetro do HI < 2mm, em relação ao diâmetro do ATM isolado. (CLEELAND; SQUIRES, 1991).

4.6 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como Média \pm Erro Padrão da Média (EPM).

5. RESULTADOS

5.1 Análise fitoquímica do EBHSPg

A análise fitoquímica do EBHSPg detectou a presença das seguintes classes químicas: flavonóides, taninos pirogálicos, saponinas e triterpenóides (tabela 1), confirmada através dos produtos obtidos em cada reação (Figuras 7 a 10).

Tabela 1- Análise fitoquímica do EBHSPg de folhas de *P. guajava* L.

CLASSE	Presença/Ausência
QUÍMICAS	
Flavonóides	+
Taninos pirogálicos	+
Taninos catéquicos	-
Alcalóides	-
Saponinas	+
Heterosides	-
digitálicos	
Antocianinas	-
Esteróides	-
Triterpenóides	+

(+) Presença. (-) Ausência.

Fonte: elaborada pelo autor (2015).

Figura 7: Teste para flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas.



Coloração vermelho-alaranjada indicando a presença de flavonóides.

Fonte: elaborada pelo autor (2015).

Figura 8: Teste para taninos.



Coloração azul escuro, indicando positividade para taninos pirogálicos, no tubo da esquerda. Tubo da direita com a cor natural do extrato.

Fonte: elaborada pelo autor (2015).

Figura 9: Teste para saponinas.



Formação de espuma persistente, indicando positividade para saponinas.

Fonte: elaborada pelo autor (2015).

Figura 10: Teste de Lieberman-Burchard (esteróides e triterpenóides).



Coloração parda-avermelhada indicando a presença de triterpenóides.

Fonte: elaborada pelo autor (2015).

5.2 Determinação do potencial antimicrobiano do EBHSPg

5.2.1 Determinação da atividade antimicrobiana do EBHSPg pelo método de difusão em ágar

O EBHSPg inibiu o crescimento das cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P (sensível a oxacilina), *Salmonella cholerae-suis* subespécie *cholerae-suis* ATCC 10708, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e *Escherichia coli* ATCC 10536, mas não apresentou potencial inibitório sobre a *Candida albicans* ATCC 10231, nas concentrações testadas (Tabela 2; Figuras 10 a 13).

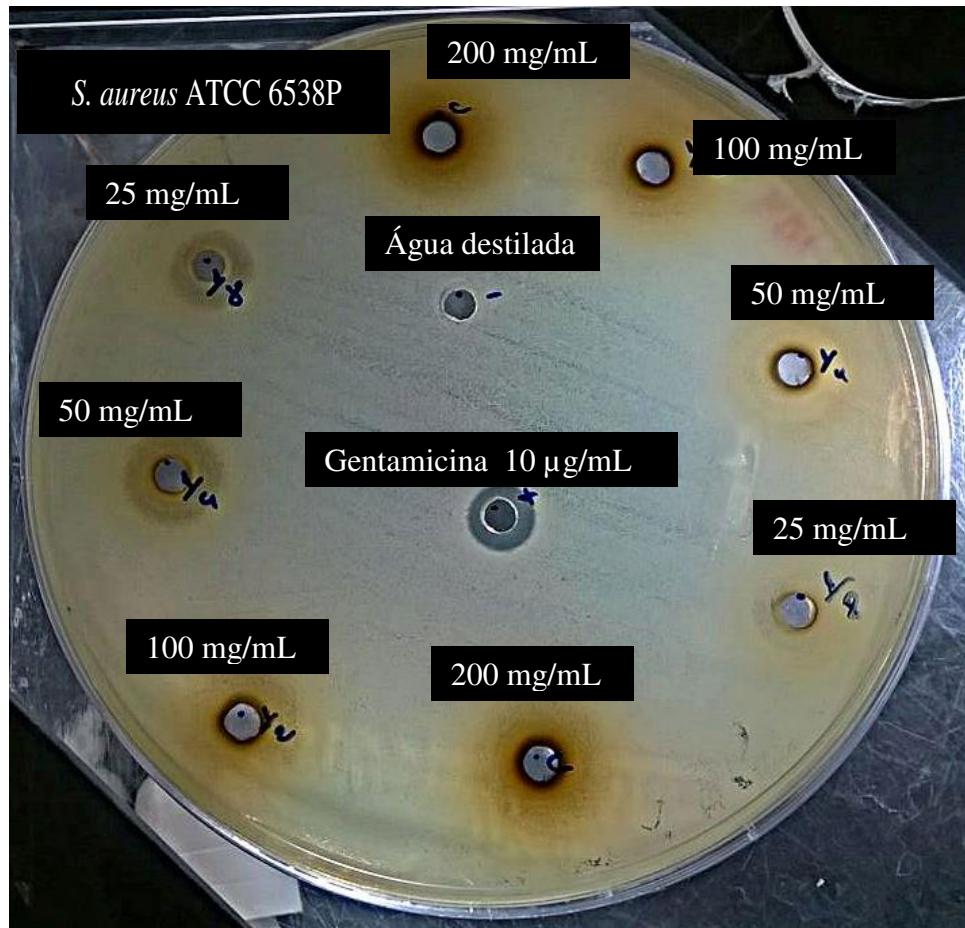
Tabela 2- Potencial antimicrobiano do EBHSPg sobre cepas-padrão determinado pela técnica de difusão em ágar (CLSI, 2003).

Concentração (mg/mL)	Diâmetro dos halos de inibição do crescimento (mm)*				
	Cepas Microbianas				
	<i>S.aureus</i> ATCC 6538P	<i>S.cholerea- suis</i> ATCC 10708	<i>P.aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>C.albicans</i> ATCC 10231	<i>E.coli</i> ATCC 10536
200	10,5 ± 0,5	23,0 ± 1,0	11,5 ± 0,5	-	7,5 ± 0,5
100	7,0 ± 0,0	22,0 ± 0,0	9,5 ± 0,5	-	-
50	-	20,5 ± 0,5	8,5 ± 0,5	-	-
25	-	19,0 ± 0,0	7,0 ± 0,0	-	-
Gentamicina	12,0 ± 0,0	13 ± 0,0	11 ± 0,0	-	14,0 ± 0,0
Miconazol	-	-	-	17,0 ± 0,0	-
Água destilada	-	-	-	-	-

(*): Média ± EMP dos halos de inibição do crescimento (mm) de dois ensaios; Volume de extrato aplicado em cada poço: 40uL; Diâmetro interno do poço: 6 mm. (-): Sem potencial antimicrobiano; Controles de inibição: Gentamicina 10 µg/mL (cepas bacterianas) e Miconazol 32µg/mL (levedura); Controle de não-inibição: Água destilada estéril (sem atividade).

Fonte: elaborada pelo autor (2015).

Figura 11: Potencial antimicrobiano do EBHSPg sobre a cepa *S. aureus* ATCC 6538P



Volume de EBHSPg no poço: 40 μ L;

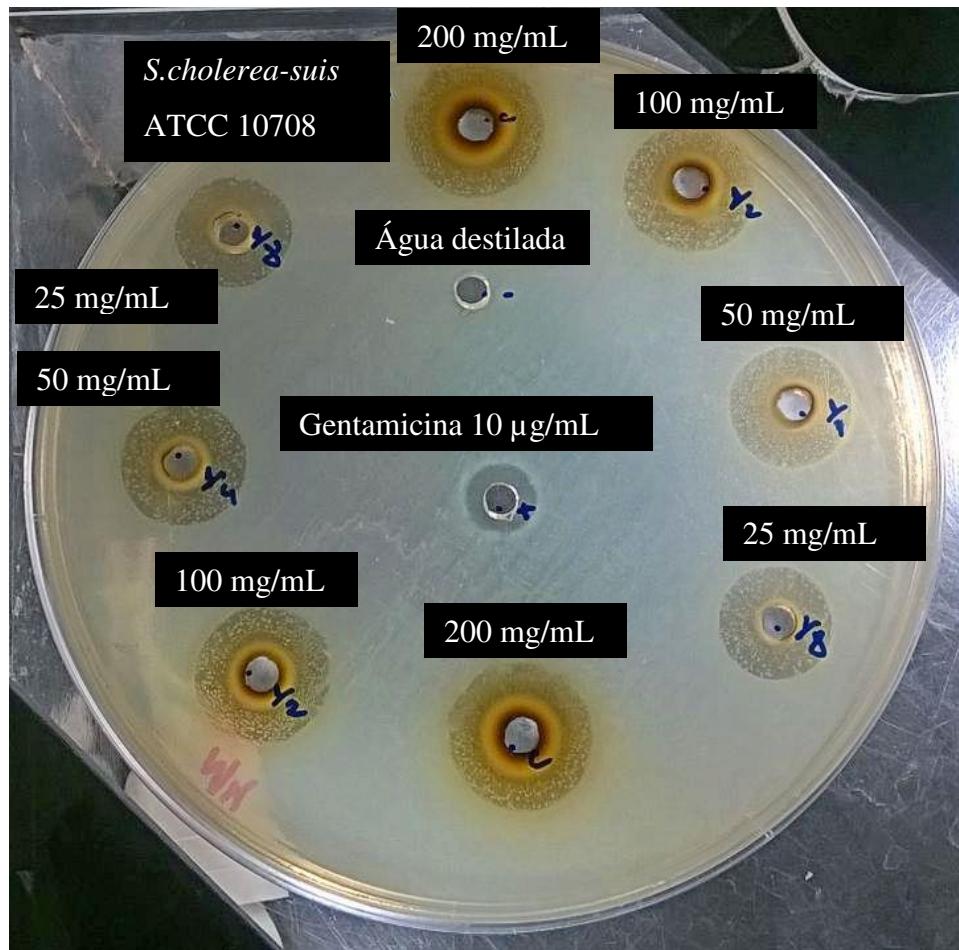
Diâmetro interno dos poços: 6mm;

Controles do experimento: Gentamicina 10 μ g/mL e Água destilada;

Houve inibição do crescimento bacteriano até a concentração de 100mg/mL;

Fonte: elaborada pelo autor (2015).

Figura 12: Potencial antimicrobiano do EBHSPg sobre a cepa *S. cholere-a-suis* ATCC 10708



Volume de EBHSPg no poço: 40 μ L;

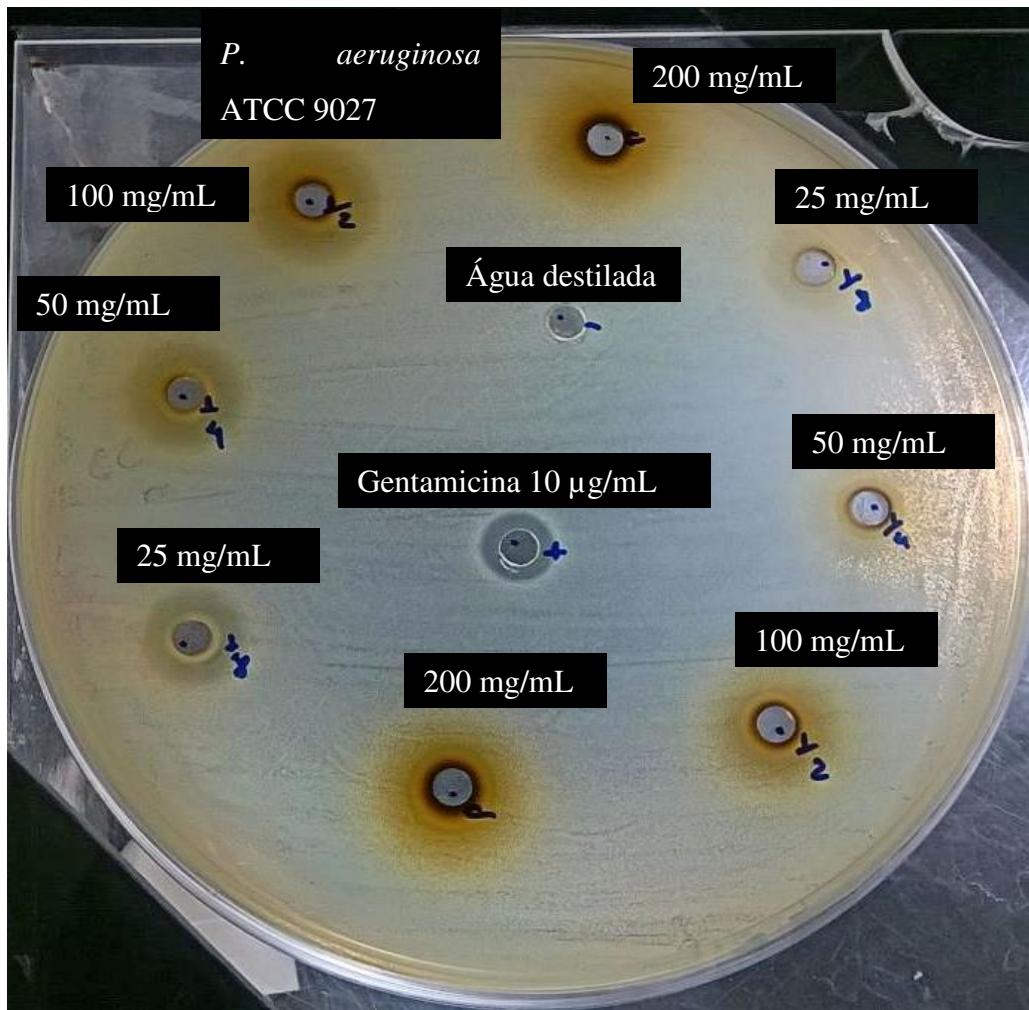
Diâmetro interno dos poços: 6mm;

Controles do experimento: Gentamicina 10 μ g/mL e Água destilada;

Houve inibição do crescimento bacteriano até a concentração de 25mg/mL (embora tenha crescido colônias resistentes dentro dos halos).

Fonte: elaborada pelo autor (2015).

Figura 13: Potencial antimicrobiano do EBHSPg sobre a cepa *P. aeruginosa* ATCC 9027



Volume de EBHSPg no poço: 40 μ L;

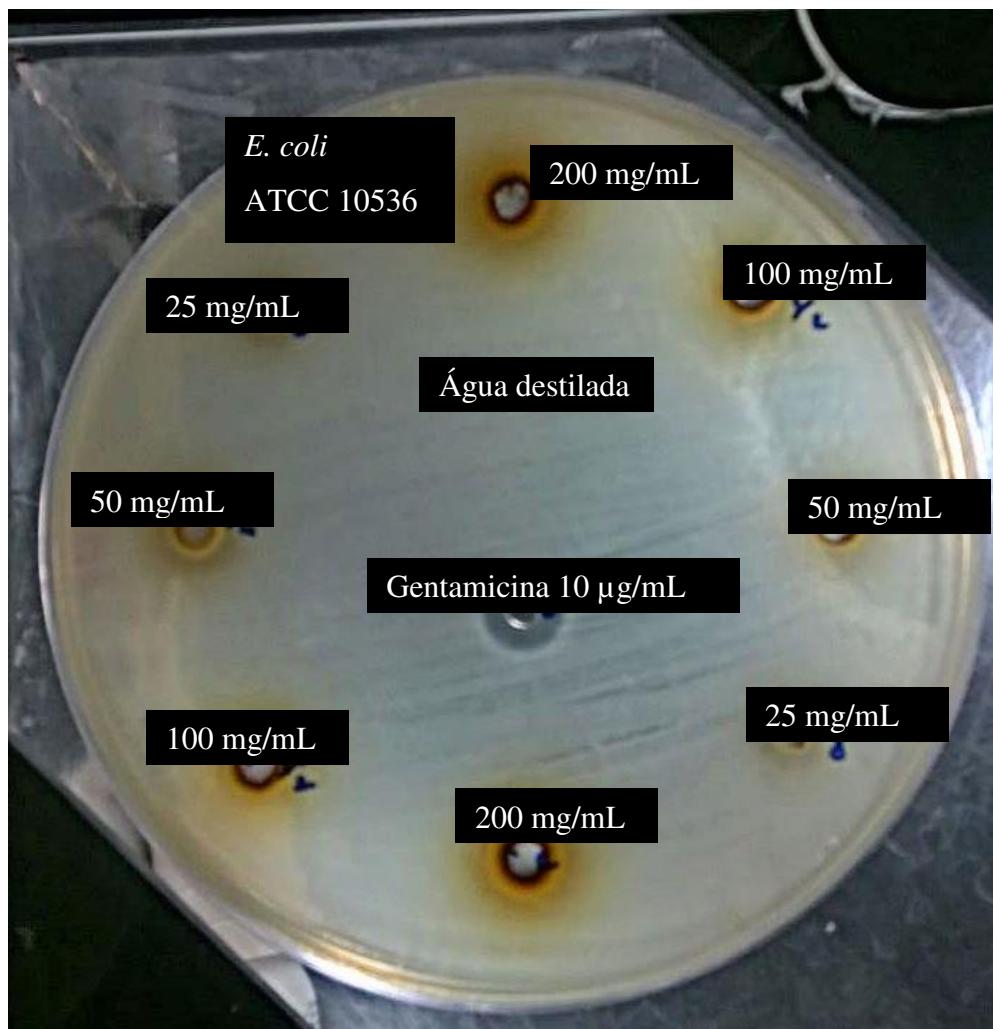
Diâmetro interno dos poços: 6mm;

Controles do experimento: Gentamicina 10 μ g/mL e Água destilada;

Houve inibição do crescimento bacteriano até a concentração de 25mg/mL;

Fonte: elaborada pelo autor (2015).

Figura 14: Potencial antimicrobiano do EBHSPg sobre a cepa *E.coli* ATCC 105



Volume de EBHSPg no poço: 40 μ L;
 Diâmetro interno dos poços: 6mm;
 Controles do experimento: Gentamicina 10 μ g/mL e Água destilada;
 Houve inibição do crescimento bacteriano na concentração de 200mg/mL.
 Fonte: elaborada pelo autor (2015).

Considerando os diâmetros dos halos de inibição (HI) de crescimento microbianos determinados pela ação do EBHSPg, nas concentrações testadas no estudo, os resultados indicam que a cepa *S. cholerae-suis* apresentou maior sensibilidade, com o diâmetro dos halos variando de 19,0 mm a 23,0 mm (porém, formaram-se colônias dentro dos halos), seguido de *P. aeruginosa* com HI= 7,0 mm a 11,5 mm, *S. aureus* com HI= 7,0 a 10,5 mm e *E. coli* com HI= 7,5 mm. A menor concentração de EBHSPg capaz de inibir o crescimento das cepas *S. cholerae-suis* e *P. aeruginosa* foi de 25 mg/mL.

5.2.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Letal Mínima (CLM)

Para a determinação de CIM e CLM do EBHSPg o EBHSPg foi testado nas concentrações de 40 mg/mL a 0,019 mg/mL, a Gentamicina nas concentrações 50 µg/mL e o Miconazol nas concentrações 160 µg/mL.

Os resultados da CIM e CLM de EBHSPg estão apresentados na Tabela 3. Como a detecção visível (a “olho nu”) não foi possível devido à turvação natural apresentada pelo extrato, então utilizou-se o corante resazurina para possibilitar a leitura da CIM, através da mudança de coloração de azul para rosa. Os valores de CIM foram obtidos pela leitura de absorbância a 570 nm em leitor de Elisa (Bio-Tek). Observe as figuras 15 e 16.

Tabela 3: CIM e CLM do EBHSPg sobre cepas padrão, determinada pela técnica da microdiluição em caldo (CLSI, 2003) e pela técnica da microgota (ROMEIRO, 2007).

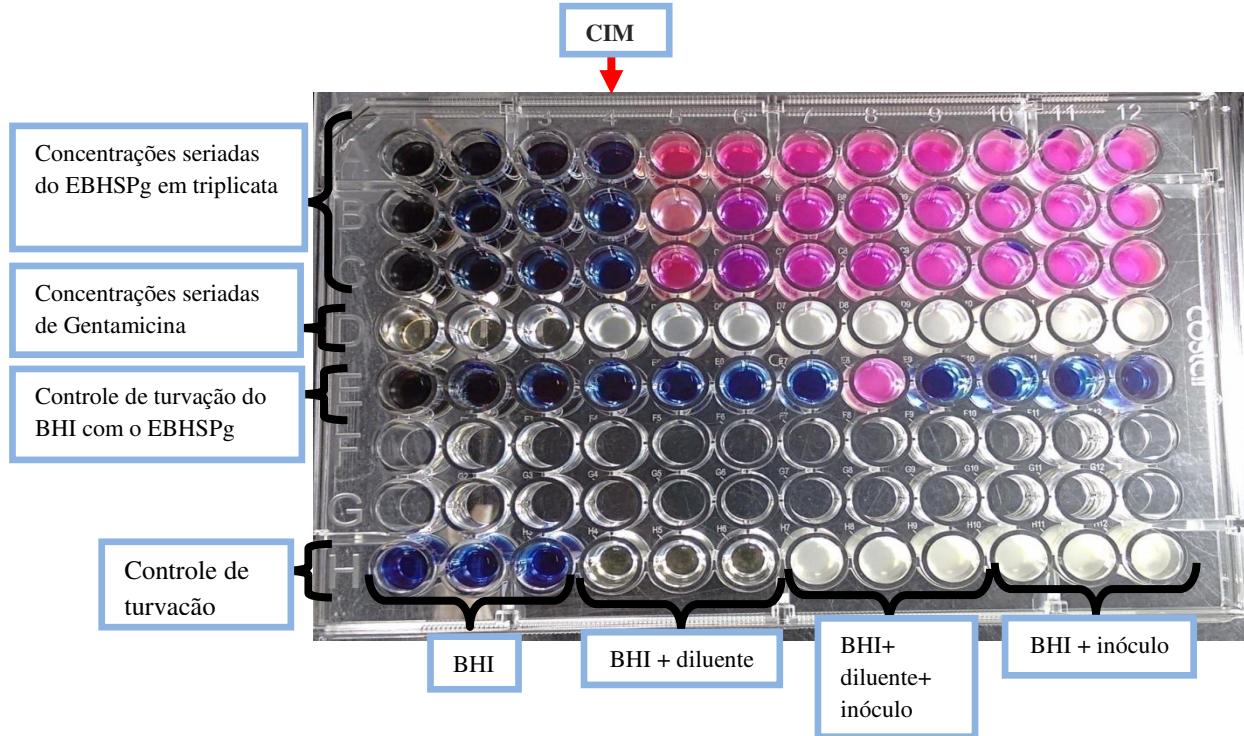
MICRORGANISMO	EBHSPg (mg/mL)	
	CIM*	CLM**
<i>S. aureus</i> ATCC 6538P	20	Nd
<i>E. coli</i> ATCC 10536	Nd	Nd
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	5	Nd
<i>Salmonela cholerae-suis</i> ATCC 10708	5	Nd
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	Nd	Nd

*Menor concentração de extrato capaz de inibir completamente o crescimento microbiano determinado através do método da Resazurina. **Menor concentração de extrato que determinou uma redução do crescimento microbiano de > 99,9% de inoculo inicial. Controles: Gentamicina (50 µg/mL), Miconazol (160 µg/mL), água destilada estéril. Volume aplicado em cada poço de extrato: 40 µL. Nd= Não foi possível determinar para as concentrações testadas.

Fonte: elaborada pelo autor (2015).

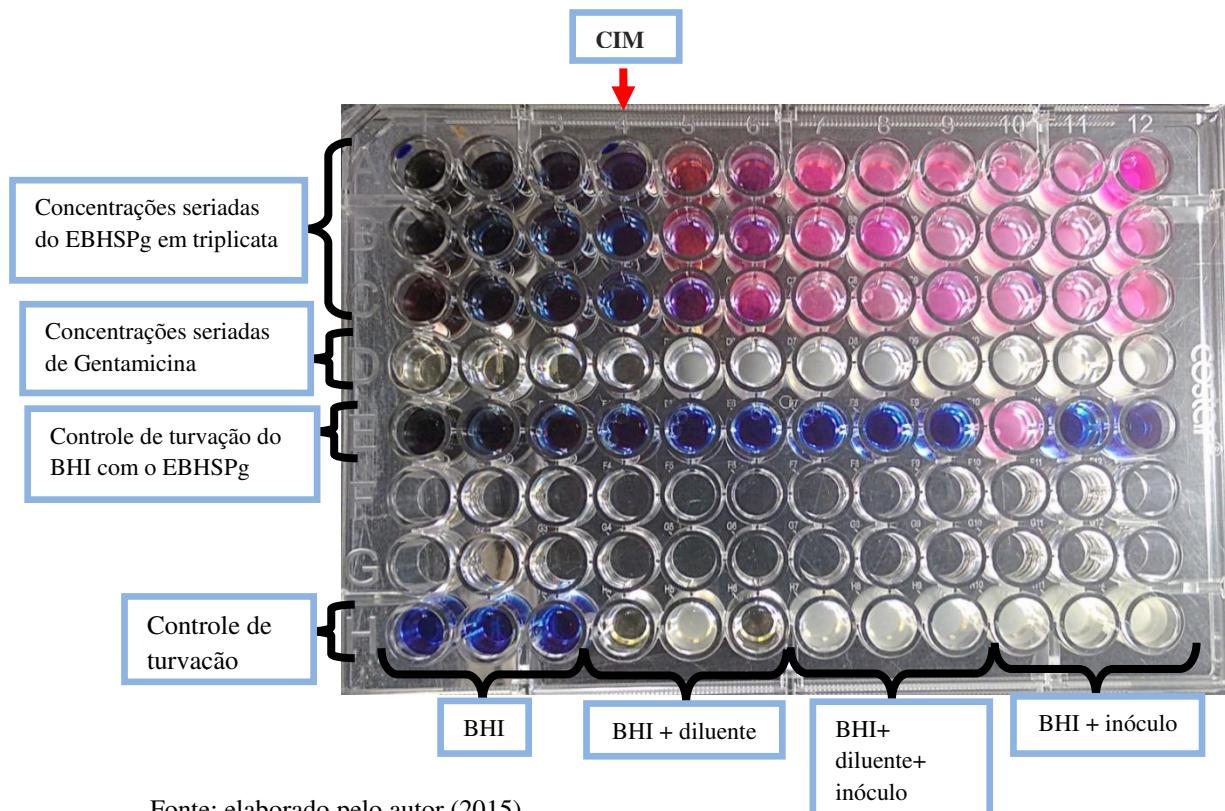
A CIM do EBHSPg foi de 5 mg/mL para *Salmonela cholerae-suis* ATCC 10708 e para *P. aeruginosa* ATCC 9027. Não foi possível determinar a CLM para as cepas testadas neste estudo, dentro das concentrações do EBHSPg analisadas.

Figura 15- Microplaca para determinação da CIM de EBHSPg para *Salmonela cholerae-suis* ATCC 10708.



Fonte: elaborado pelo autor (2015).

Figura 16- Microplaca para determinação da CIM de EBHSPg para cepa *P. aeruginosa* ATCC 9027.



Fonte: elaborado pelo autor (2015).

5.2.3 Estudo do efeito modulador do EBHSPg na atividade de antibióticos de uso clínico

A modulação do EBHSPg na atividade antimicrobiana de antibióticos de uso clínico (Gentamicina- GEN, Cefoxitina- CFO, Ciprofloxacina- CIP e Ampicilina- AMP) foi determinada sobre *P. aeruginosa* ATCC 9027, *Salmonella cholerae-suis* sub espécie *cholerae-suis* ATCC 10708 e *S. aureus* ATCC 6538P. Os ATM testados pertencem a quatro classes: aminoglicosídeo (GEN), cefamicina (CFO), quinolona (CIP) e penicilina (AMP). Os diâmetros dos HI de crescimento microbiano determinados por cada associação EBHSPg+ATM foram comparados aos determinados pelo ATM isoladamente, permitindo avaliar o efeito modulador do EBHSPg na atividade antimicrobiana de diferentes antibióticos de uso clínico.

Tabela 4: Efeito modulador do EBHSPg na atividade antibacteriana de antibióticos de uso clínico sobre cepas padrão.

Antibióticos	Microrganismos		
	<i>S. aureus</i> ATCC 6538P	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>Salmonela</i> <i>cholera-suis</i> ATCC 10708
GEN	HI_{ATM}	18 (S)	21,5 (S)
	HI_{EBHSPg-ATM}	14,5↓	21↓
CFO	HI_{ATM}	26,5 (S)	28 (S)
	HI_{EBHSPg-ATM}	26,5*	28,5 *
CIP	HI_{ATM}	25,5 (S)	35,5 (S)
	HI_{EBHSPg-ATM}	25,5 *	36*
AMP	HI_{ATM}	20,5 (S)	0 (R)
	HI_{EBHSPg-ATM}	18,5 ↓	10↑
			13,5 ↑

Média de dois experimentos. (S) Sensível, (R) Resistente. GEN – Gentamicina (30µg), CFO – Cefoxitina (30µg), CIP – Ciprofloxacina (5µg), AMP – Ampicilina (10µg). Discos de ATM foram impregnados com 20µL da CIM do extrato para cada cepa testada. HI: diâmetro do halo de inibição de crescimento em mm. HI_{EBHSPg-ATM}: HI determinado pela associação EBHSPg-ATM. HI_{ATM}: HI determinado pelo antibiótico isolado. Efeito sinérgico (↑): HI_{EBHSPg-ATM} ≥ HI_{ATM} + 2mm; Efeito antagônico (↓): HI_{EBHSPg-ATM} < HI_{ATM}; Efeito indiferente (*): HI_{EBHSPg-ATM} < HI_{ATM} + 2 (CLEELAND; SQUIRES, 1991).

Fonte: elaborada pelo autor (2015).

Os resultados obtidos mostram que a modulação do EBHSPg na eficiência do ATM sobre as cepas testadas, variou para os diferentes ATM utilizados. Verificou-se que o EBHSPg apresentou sinergismo apenas quando associado à AMP sobre as cepas *P. aeruginosa* ATCC 9027 e *Salmonella cholerae-suis* ATCC 10708. Entretanto, sobre a cepa *S.*

aureus ATCC 6538P mostrou efeito antagônico. Para a associação dos outros antibióticos com o EBHSPg foram detectados 77,8% de efeito indiferente e 22,20% de efeito antagônico.

6. DISCUSSÃO

O efeito antimicrobiano do extrato analisado pode ser atribuído, principalmente, aos flavonóides e os taninos, que são compostos fenólicos, os quais possuem muitos relatos de atividade antimicrobiana. A maioria deles é capaz de inibir microrganismos e fatores de virulência, além de poderem apresentar sinergismo com antibióticos (VAQUERO *et al.*, 2010).

Taninos são compostos polifenólicos e podem ser do tipo hidrolisável ou condensado, possuem atividade antimicrobiana conhecida e comprovada em vários estudos de extratos vegetais, estão presentes em diversos vegetais, tornando-os fontes de substâncias biologicamente ativas (BEZERRA *et al.*, 2011; FERREIRA *et al.*, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2014). Estudos sugerem que a atividade antimicrobiana dos taninos se deve à habilidade de formar complexos com proteínas que são insolúveis em água (MONTEIRO *et al.*, 2005).

Os possíveis mecanismos que podem explicar o efeito dos taninos na inibição do crescimento bacteriano são a desestabilização da membrana citoplasmática, a permeabilização da membrana das células, a inibição das enzimas extracelulares, uma vez que afetam diretamente o metabolismo microbiano e a privação de substratos necessários para o crescimento de microorganismos, especialmente minerais essenciais como ferro e zinco (HEINONEN, 2007).

Flavonóides são metabólitos secundários polifenólicos que possuem conhecida atividade antimicrobiana *in vitro* sobre diversos patógenos (PANIZZI *et al.*, 2002). Essa atividade deve-se, provavelmente, a três mecanismos: perfuração e/ou redução da membrana plasmática das bactérias (COWAN, 1999), inibição de ácidos nucléicos (NAVARRO-MARTÍNEZ *et al.*, 2005; GRADISAR *et al.*, 2007) e inibição da síntese de energia (ATP) (CHINNAM *et al.*, 2010)

Os triterpenóides são compostos orgânicos que têm várias propriedades farmacológicas, dentre elas o efeito antimicótico e antibiótico (DZUBAK *et al.*, 2006). As saponinas são glicosídeos de esteróides ou de terpenos policíclicos, com atividade antimicrobiana importante, e efeito inibitório sobre bactérias Gram positivo, como a *S. aureus* (VERDI *et al.*, 2005; BISWAS *et al.*, 2013).

A abordagem fitoquímica do extrato bruto hidroalcoólico seco das folhas de *Psidium guajava L.* indicou a presença de flavonóides, taninos pirogálicos, saponinas e triterpenóides. Tais resultados são condizentes com o que é apresentado na literatura. Uma revisão dos metabólitos secundários identificados nessa espécie mostrou que seus principais constituintes são taninos, flavonóides, óleos essenciais, saponinas, alcoóis sesquiterpenóides (VENDRUSCOLO *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2007; GUTIÉRREZ *et al.*, 2008).

Silva *et al.* (2013) analisaram o extrato hidroetanólico de folhas de goiabeira e encontraram três classes de metabólitos secundários: taninos, saponinas e flavonóides. Amancio e colaboradores. (2015) fizeram extratos hidroalcoólicos de folhas verdes e folhas secas e testaram sua composição fitoquímica. Em ambos os extratos foram encontrados taninos, saponinas, antraderivados e traços de alcalóides, mas negativos para flavonóides, devido, possivelmente, ao período da coleta, que pode influenciar na composição química das folhas.

Iha *et al.* (2008) fracionaram o extrato etanólico dos frutos da goiabeira em diclorometano, acetato de etila e n-butanol. Em seguida, fizeram uma cromatografia em camada delgada para flavonóides e outra para taninos, usando diferentes fases móveis e diferentes reveladores. O resultado foi a detecção de taninos na fração extraída com acetato de etila e a presença de flavonóides na fração butanólica.

Biswas *et al.* (2013) ao avaliarem extratos de *Psidium guajava L.* obtido em quatro solventes diferentes (água destilada, etanol, metanol e n- hexano) constataram que a polaridade do solvente e o método utilizado influenciam no aparecimento ou na ausência de alguns constituintes fitoquímicos, o que altera os resultados. Os extratos aquosos apresentaram os seguintes constituintes: taninos, saponinas, terpenóides, flavonóides e glicosídios. Já os extratos etanólicos e metanólicos revelaram a presença de taninos, terpenóides, flavonóides e glicosídios. Em n-hexano, nenhum desses componentes foram encontrados.

No presente estudo, o extrato hidroalcoólico obtido das folhas de *Psidium guajava L.* apresentou um rendimento de 16,70%, que é satisfatório se comparado a outros estudos, como o de Silva *et al.* (2013), que fizeram o processo de maceração com folhas de *Psidium guajava L.* em etanol 70% e obtiveram um extrato hidroalcoólico com 16,42% em relação ao material seco.

Existem vários métodos que podem ser utilizados na avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos vegetais, sendo os mais conhecidos: método de

difusão em ágar e métodos de macrodiluição e microdiluição em caldo de cultura. Na determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) ou da Concentração Letal Mínima (CLM) de extratos vegetais, tem-se utilizado mais frequentemente o método de microdiluição em caldo. Porém, para cada teste existem variações que podem alterar os resultados (OSTROSKY *et al.*, 2008).

Segundo Fennel *et al.* (2004), as variações referentes à determinação da CIM (Concentração Inibitória Mínima) podem ser atribuídas a fatores, como: a técnica aplicada, a quantidade do extrato testada, o microrganismo utilizado no teste, a origem da planta e se os extratos foram preparados a partir de plantas frescas ou secas. Dessa forma, não existe método padronizado para expressar o resultado de testes antimicrobianos de produtos naturais.

Além disso, outras variáveis também podem interferir nos resultados dos testes: forma de preparo do extrato, a diferença na composição química da planta, que depende de fatores ambientais, como: local, condições de cultivo e época de colheita, a concentração e origem do ágar usado no meio de cultura, pH do sistema, condições de incubação, disponibilidade de oxigênio e quantidade do inóculo (OSTROSKY *et al.*, 2008).

A fim de solucionar a falta de uniformidade nos critérios de seleção para o estudo da atividade antimicrobiana foi proposto a utilização dos métodos de difusão em ágar e de diluição em caldo como métodos padrões para o estudo de extratos de plantas e de óleos essenciais, bem como de seus compostos. Portanto, uma alternativa para se obter resultados mais confiáveis é a realização de pesquisas que utilizam mais de um método para se avaliar a atividade antimicrobiana (RIOS, 2005).

No presente trabalho, foram utilizadas as duas técnicas mencionadas acima para avaliar a atividade antimicrobiana do EBHSPg. As cepas microbianas utilizadas foram bactérias Gram positivo (*S. aureus*), bactérias Gram negativo (*E. coli*, *P. aeruginosa* e *Salmonella cholerae-suis*) e uma levedura (*C. albicans*). No teste de difusão em ágar, o EBHSPg inibiu o crescimento de todas as bactérias, Gram positivo e Gram negativo, porém não foi eficaz sobre a levedura testada.

Os estudos realizados no presente trabalho mostraram que, no teste de difusão em ágar, detectou-se que as cepas mais sensíveis a ação do EBHSPg foram a cepa *S. cholerae-suis*, com o diâmetro dos halos variando de 19,0 mm a 23,0 mm, seguido de *P.*

aeruginosa (7,0 a 11,5 mm), *S. aureus* (7,0 a 10,5 mm) e *E. coli* (7,5 mm). Porém, não apresentou potencial inibitório sobre a *Candida albicans*. A menor concentração em que houve formação de HI foi de 25 mg/mL, inibindo o crescimento das cepas *S. cholerae-suis* e *P. aeruginosa*.

Biswas *et al.* (2013) avaliaram extratos de folhas de *Psidium guajava L.* nos solventes água destilada, etanol, metanol e n- hexano contra bactérias Gram positivo (*S. aureus* e *B. cereus*) e bactérias Gram negativo (*E. coli* e *S. enteritidis*) e verificaram que apenas os extratos etanólicos e metanólicos apresentaram atividades sobre bactérias, no entanto inibiram o crescimento das bactérias Gram positivo, mas não tiveram efeito contra as Gram negativo. Para os extratos com ação antimicrobiana, foram obtidos os seguintes resultados no teste de disco-difusão, utilizando 200mg/mL dos extratos: o extrato metanólico determinou zona de inibição de 8,27mm e 12,11mm sobre cepas de *S. aureus*, enquanto o extrato etanólico determinou zona de inibição de 6, 11mm e 11,00 mm sobre *B. cereus*. Os resultados de Biswas *et al.* (2013) concordam, parcialmente, com o presente trabalho, pois o EBHSPg testado mostrou-se eficiente contra *S. aureus*, apesar de também ter atividade contra cepas de bactérias Gram negativo.

No teste de microdiluição em caldo, os menores valores de CIM do EBHSPg (5 mg/mL) foram encontrados para *P. aeruginosa* e *Salmonela cholerae-suis*. Para cepa *S. aureus*, a CIM foi de 20mg/mL, indicando uma melhor atividade do EBHSPg sobre cepas Gram negativo, apesar de não ter apresentado efeito sobre *E. coli*. As cepas de *C. albicans* não foram inibidas pelas concentrações de extrato utilizadas nesse estudo, nas condições em que os testes foram realizados.

Diferenças na atividade antimicrobiana do extrato de *Psidium guajava L.* sobre bactérias Gram negativo ou Gram positivo podem estar relacionadas ao uso de diferentes frações etanol-água, culminando com a extração de moléculas capazes de penetrar na membrana de bactérias Gram negativo, mas não das bactérias Gram positivo (DUFFY; POWER, 2005).

Bona e colaboradores (2014) analisaram extrato alcoólico e extrato aquoso de folhas de *Psidium guajava L.*, ambos em concentrações que variaram 0,04 a 100 mg/mL, contra cepas de bactérias Gram positivo, Gram negativo e uma levedura. Os resultados mostraram que os extratos não inibiram a levedura *C. albicans* na técnica de disco-difusão, o

que corrobora com o presente trabalho. No teste de microdiluição, as CIMs para bactérias Gram positivo variaram de 6,25 a 100 mg/mL, já as CIMs para bactérias Gram negativo variaram entre 0,39 a 25 mg/mL, o que mostra que as bactérias Gram negativo foram mais suscetíveis ao extrato, o que está de acordo com o presente estudo.

Verificou-se que o EBHSPg apresentou sinergismo apenas quando associado à ampicilina sobre as cepas *P. aeruginosa* e *Salmonella cholerae-suis*, ou seja, para 66,7% das cepas testadas, já contra a cepa *S. aureus*, o efeito foi antagônico. Tal resultado é compreensível, visto que, a ampicilina sozinha não foi capaz de inibir as bactérias Gram negativo testadas. Assim, quando associada ao extrato estudado, este garantiu um efeito antimicrobiano sobre as cepas de *P. aeruginosa* e *Salmonella cholerae-suis*, inibindo-as e apresentando halos de inibição de 10 mm e 13,5 mm, respectivamente. Com relação à *S. aureus*, observou-se que a ampicilina sozinha teve bom efeito sobre ela, mas, quando associada ao extrato, teve seu potencial antimicrobiano diminuído, já que foi verificado que a *S. aureus* foi pouco sensível ao extrato nos testes de difusão em ágar e de diluição em caldo.

A ampicilina pertence ao grupo das aminopenicilinas, betalactâmicos de espectro aumentado, possuindo ação antimicrobiana sobre bactérias Gram positivo e Gram negativo (KATZUNG, 2007). Porém, devido a mecanismos de resistência bacteriana, por produção de betalactamase, algumas cepas não são sensíveis a ação de penicilinas, como se pôde observar no caso da ampicilina com relação às bactérias Gram negativo utilizadas nessa pesquisa.

Os resultados obtidos mostram que a modulação do EBHSPg na eficiência do ATM sobre as cepas testadas variou para os diferentes ATM utilizados e para as diferentes cepas testadas, pois a associação dos outros antibióticos com o EBHSPg contra as cepas testadas teve 77,8% de efeito indiferente e 22,20% de efeito antagônico. Para estes resultados, a ação moduladora do EBHSPg não foi tão significativa, porém o uso de produtos vegetais juntamente com antimicrobianos de uso clínico é bem documentado, mostrando os benefícios dessa associação para combater microrganismos multirresistentes (NCUBE *et al.*, 2011; FIGUEIREDO *et al.*, 2013; BARRETO *et al.*, 2014; PEREIRA *et al.*, 2014).

As pesquisas com relação ao efeito modulador de extratos de plantas e outros componentes têm se tornado uma atividade fundamental nos últimos anos, pois a busca da melhora terapêutica acontece através do efeito sinérgico resultante da mistura de

compostos bioativos e substâncias antimicrobianas (WAGNER, ULRICH-MERZENICH, 2009).

7. CONCLUSÃO

O EBHSPg possui boa atividade antimicrobiana e largo espectro de ação sobre bactérias Gram-positivo e Gram-negativo, e modula positivamente a ação da ampicilina sobre bactérias Gram-negativo. Porém, não inibi o crescimento de *C. albicans*.

Compostos antimicrobianos, como taninos, flavonóides, saponinas e triterpenóides, fazem parte da composição do EBHSPg e podem explicar sua ação antibiótica.

Nossos resultados mostram que folhas maduras de *Psidium guajava L.* podem ser usadas como alternativa ao uso das folhas jovens na medicina popular, pois apresentam boa atividade antimicrobiana.

Porém, é preciso que se façam novas pesquisas para determinar o mecanismo de ação do EBHSPg, assim como ensaios de toxicidade, que forneçam base para o uso correto e seguro de *Psidium guajava L.*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELRAHIM, S. I.; ALMAGBOUL, A. Z.; OMER, M.E.A.; ELEGAMI, A. Antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. **Fitoterapia**, v. 73, n. 7-8, p. 713-715, 2002.
- AHMAD, I.; BEG, A.Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian plants against multi-drug resistant human pathogens. **J. of Etnopharmacol**, v. 74, p. 113-123. 2001.
- AMANCIO, A.M.; REIS, L.O.; PEREIRA, J.B.B.; LUCIA, M.; MALAQUIAS, L.C.C.; CHAVASCO, J.K. Estudo da ação antimicrobiana de plantas do gênero *Psidium*. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações- MG, v. 13, n. 1, p- 644-652, 2015.
- ANDERSSON, D. I.; HUGHES, D. Antibiotics resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? **Nat. Rev. Microbiol.**, v.8, n.4, p. 260-271. Apr 2010. ISSN 1740 – 1534 (Eletronic) 1740 – 1526 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20208551>>.
- ASSIS, M. A.; MORELLI-AMARAL, V. FRANCISCO; PIMENTA, FABRICIA P. Grupos de pesquisa e sua produção científica sobre plantas medicinais: um estudo exploratório no estado do Rio de Janeiro. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, v. 9, n.1, p. 1-70, 2015.
- BARON, E. J.; PETERSON, I. R.; FINEGOLD, S. M. **Diagnostic Microbiology**. 9 ed. Mosby, St. Louis: 1994.
- BARRETO, H.M., SILVA-FILHO, E.C.; LIMA, E.D.O.; COUTINHO, H.D.M.; MORAIS-BRAGA MFB; TAVARES, C.C.A., et al. Chemical composition and possible use as adjuvant of the antibiotic therapy of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. **Ind Crops Prod**, v.59, p.290-294, 2014.
- BATISTA, A. H. M. **Atividade antimicrobiana e mecanismo de ação da Violaceína sobre cepas de *Staphylococcus aureus* produtoras de biofilme**. 2014. 119f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, 2014.
- BAUER, A.W., et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.45, n.4, p. 493, 1966. ISSN 0002-9173.
- BEVILACQUA, H. G. C. R. Planejamento de horta medicinal e comunitária. Divisão Tec. Esc. Municipal de Jardinagem / Curso de Plantas Medicinais – São Paulo, 2010. Disponível em: <<http://www.google.com.br/q=nuplan+plantas+medicinais>>.
- BEZERRA, D.A.C.; RODRIGUES, F. F. G.; COSTA, J.G.M.; PEREIRA, A.V.; SOUSA, E.O.; RODRIGUES, O.G. Abordagem fitoquímica, composição bromatológica e atividade antibacteriana de *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret e *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 33, p. 99-106, 2011.
- BISPO, N.J.; FRANCISCO, N.M.A.C.; SCHIMITT, A.C. Avaliação da atividade antimicrobiana in vitro dos extratos da planta *Guettarda angelica* sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. **LAES & HAES**, v. 168, n. 1, p. 165-169. 2007.

BISWAS, B.; ROGERS, K.; MCLAUGHLIN, F.; DANIELS, D.; YADAV, A. Antimicrobial activities of leaf extracts of Guava (*Psidium guajava* L.) on two Gram- negative and two Gram-positive bacteria. **International Journal of Microbiology**, v. 2013, art. ID 746165, p. 1-7, 2013.

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. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo , v. 81, n. 3, p. 218-225, set., 2014 .

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 60p. (Série B. Textos Básicos de Saúde).

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 10, de 09 de março, Brasília, 2010.

CAMPOS, L. Z. O. **Etnobotânica do gênero Psidium L. (Myrtaceae) no cerrado brasileiro**. 2010. 86f. Dissertação (Mestrado) – Departamento de pós- graduação em Botânica do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, 2010.

CARNEIRO, F. M.; SILVA, M.J.P.; BORGES, L.L.; ALBERNAS, L.C.; COSTA, J.D.P. TENDÊNCIAS DOS ESTUDOS COM PLANTAS MEDICINAIS NO BRASIL. **Revista Sapiência: sociedade, saberes e práticas educacionais (ISSN 2238-3565)**, v. 3, n. 2, p. 44-75, 2014.

CHAH, K. F.; EZE, C. A.; EMUELOSE, C. E.; ESIMONI, C. O. Antibacterial and wound healing properties of methanolic extracts of some Nigerian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 104, p. 164-167, 2006.

CHINNAM, N.; DADI, P.K.; SABRI, S.A.; AHMAD, M.; KABIR, M.A. AHMAD, Z. Dietary bioflavonoids inhibit Escherichia coli ATP synthase in a differential manner. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 46, p. 478–86, 2010.

CHOU, T.C. Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method. **Cancer Res.** v. 70, n. 2, p. 440-6. 2010.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials in vitro and in experimental animal infections. **Antibiotics in laboratory medicine**, v.3, p. 739-787, 1991.

CLINICAL AND A LABORATORY STANDARDS INSTITUTE – Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Teste. 8 ed. Approved Standard: M2-A8. CLSI, 2003.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. Norma aprovada 3^a ed. Wayne, PA, **CLSI document M31-A3**, 2008.

COSTA, I. R. Estudos evolutivos em Myrtaceae: aspectos citotaxonômicos e filogenéticos em Myrtae, enfatizando *Psidium* e gêneros relacionados. Tese de doutorado. UNICAMP. 2009.

- COSTELLOE, C. et al. Effect of antibiotic prescribing in primary care on antimicrobial resistance in individual patients: systematic review and meta-analysis. **BMJ**, v. 340, p. c2096, 2010. ISSN 1756 – 1833 (Eletronic) 0959 – 535X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20483949>>.
- COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 564-582, 1999.
- DUFFY, C.F.; POWER, R.F. Antioxidant and antimicrobial properties of some Chinese plant extracts. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Dunboyne, v.17, p. 527-529, 2005.
- DZUBAK, P.; HAJDUCH, M.; VYDRA, D.; HUSTOVA, A.; KVASNICA, M.; BIEDERMANN, D. Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. **Nat.Prod.Rep.**; v. 23, p. 394-411, 2006.
- FENNEL, C.W.; LINDSEY, K.L.; MC GAW, L.J.; SPARG, S.G.; STAFFORD, G.I.; ELGORASHI, E.E.; GRACE, O.M.; VAN STADEN J.REVIEW: ASSESSIN AFRICAN MEDICINAL PLANTS FOR EFFICACY AND SAFETY: PHARMACOLOGICAL SCREENING AND TOXICOLOGY. **J. Ethnopharmacol**, v. 94, p. 205-217, 2004.
- FERNANDEZ, L.; BREINDENSTEIN, E. B.; HANCOCK, R. E.; Creeping baselines and adaptive resistance to antibiotics. **Drud Resist Update**, v. 14, n. 1, p. 1 - 21. Feb 2011. ISSN 1532 – 2084 (Eletronic). 1368 – 7686 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21288762>>.
- FERREIRA, F.S.; SANTOS, S.C.; BARROS, T.F.; ROSSI-ALVA, J.C.; FERNANDEZ, L.G. Atividade antibacteriana in vitro de extratos de *Rhizophora mangle* L. **Rev. Bras. Plantas Med.**, v. 13, n. 3, p. 305-310. 2011.
- FERREIRA, P.R.B.; MENDES, C.S.O.; RODRIGUES, C.G.; ROCHA, J.C.M.; ROYO, V.A.; VALÉRIO, H.M.; OLIVEIRA, D.A. Antibacterial activity tannin-rich fraction from leaves of *Anacardium humile*. **Cienc. Rural**, v.42, p.1862-1863, 2012.
- FIGUEIREDO, F.G.; FERREIRA, E.O.; LUCENA, B.F.F.; TORRES, C.M.G.; LUCETTI, D.L.; LUCETTI E.C.P.; SILVA, J.M.F.L.; SANTOS, F.A.V.; MEDEIROS, C.R.; OLIVEIRA, G.M.M., ET AL. Modulation of the Antibiotic Activity by Extracts from *Amburana cearensis* A. C. Smith and *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan. **Biomed Res Int**. 2013;2013:640682. doi: 10.1155/2013/640682. Epub 2012 Dec 27.
- FRANCO, E. A. P.; BARROS, R. F. M. Uso e diversidade de plantas medicinais no Quilombo Olho D' água dos Pires, Esperantina, Piauí. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 8, n. 3, p. 78-88, 2006.
- GOVAERTS, R.; SOBRAL, M.; ASHTON, P.; BARRIE, F.; HOLST, B.K.; LANDRUM, L.R.; MATSUMOTO, K.; MAZINE, F.F.; NIC LUGHADHA, E.; PROENÇA, C.; SOARES-SILVA, L.H.; WILSON, P.G. & LUCAS, E. **World Checklist of Myrtaceae**. Kew, Royal Botanic Gardens. 2008. 455p.
- GRADISAR, H.; PRISTOVSEK, P.; PLAPER, A.; JERALA, R. Green tea catechins inhibit bacterial DNA gyrase by interaction with its ATP binding site. **J Med Chem.**, v. 50, 264–271, 2007.

- GUTIÉRREZ, R.M.P.; MITCHELL, S.; SOLIS, R.V. *Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry, and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v.117, n.1, p. 1-27, 2008.
- HEINONEN, M. Antioxidant activity and antimicrobial effect of berry phenolics — a Finnish perspective. **Mol. Nutr. Food Res.**, v. 51, p. 684-691, 2007.
- HEMAISWARYA, S.; KRUTHIVENTI, A.K.; DOBLE, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. **Phytomedicine**. v. 15, n. 8, p. 639-52. 2008.
- IBGE (2013). Produção Agrícola Municipal 2011. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/>>. Acesso em 20 set. 2015.
- IHA, S. M.; MIGLIATO, K. F.; VELLOSA, J. C. R.; SACRAMENTO, L. V. S.; PIETRO, R. C. L. R.; ISAAC, V. L. B.; BRUNETTI, I. L.; CORRÊA, M. A.; SALGADO, H. R. N. Estudo fitoquímico de goiaba (*Psidium guajava* L.) com potencial antioxidante para desenvolvimento de formulação fitocosmética. **Revista brasileira de farmacognosia**. 18 (3): 387 – 393. Julho / Setembro, 2008.
- KATZUNG, B. G. Farmacologia básica e clínica. 10^a edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.
- KILLION, K.H. The review of natural products. Third ed. **Facts and Comparison**. USA, p. 250-251. 2000.
- LANDRUM, L.R.; CLARK, W. D.; SHARP, W. P.; BRENDECK, J. Hybridization between *Psidium guajava* L. and *P. guineense* (Myrtaceae). **Economic Botany**. 49 (2): 153- 161. 1995.
- LANDRUM, L.R.; KAWASAKI, M.L. The genera of Myrtaceae in Brazil: An Illustrated synoptic and indentifications Keys. **Brittonia**. New York. 49 (4): 508-536. 1997.
- LEVINSON, W.; JAWETZ, E. Microbiologia Médica e Imunologia (Lange). 12^a edição. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- MAHADY, G.B. Medicinal plants for the prevention and treatment of bacterial infections. **Curr. Pharm. Design.**, v. 19, p. 2405-2423, 2005.
- MANICA, I. et al. **Goiaba: do plantio ao consumidor: tecnologia de produção, pós-colheita, comercialização**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001.
- MATOS, F. J. A. **Farmácias Vivas**. Fortaleza: UFC. 220p, 1998.
- MATOS, F. J. A.; **Farmácias Vivas**. Sistema de utilização de plantas medicinais projetado para pequenas comunidades, 4^a edição. Edições UFC. Fortaleza. 2002. 267p.
- MATOS, F.J.A., **Plantas Medicinais - guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil**. 3^a ed. Imprensa Universitária/Edições UFC, Fortaleza, 2007.

MICHELIN,D.C.; MORESCHI, P.E.; LIMA, A.C.; NASCIMENTO, G.G.F.; PAGANELLI, M.O.; CHAUD, M.V. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** v. 15, n. 4, p. 316-320, out./dez. 2005.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U.P.; ARAÚJO, E.L.; AMORIM, E.L.C. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

NASCIMENTO, G. G. F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P. C.; SILVA, G.L. Antibacterial activity of extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Braz. J. Microbiol.** v.31, n.4, p.247-256, 2000.

NATALE, H.; PRADO, R.M.; QUAGGIO, J.A.; MATTOS JUNIOR, D. Goiabeira. In: CRISÓSTOMO, L.A.; NAUMOV, A. **Adubando para alta produtividade e qualidade:fruteiras tropicais do Brasil.** Fortaleza: Embrapa Agroindustrial Tropical, 2009. P. 104-124.

NAVARRO-MARTÍNEZ, M.D.; NAVARRO-PERÁN, E.; CABEZAS-HERRERA, J.; RUIZ-GÓMEZ, J.; GARCÍA-CÁNOVAS, F.; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, F. Antifolate activity of epigallocatechin gallate against *Stenotrophomonas maltophilia*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, p. 2914-2920, 2005.

Ncube B, Finnie JF, Van Standen J. Seasonal variation in antimicrobial and phytochemical properties of frequently used medicinal bulbous plants from South Africa. **S Afr J Bot.** v.77, n.2, p. 387-396, 2011.

NEIRA, G. A.; RAMIREZ, G.M.B. Actividad antimicrobiana de extractos de espécies de guayaba contra *Streptococcus mutans* y *Escherichia coli*. **Actualidades biológicas**, n. 27, p 27-30. 2005.

NEWMAN, D.J., CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **J. Nat. Prod.** 70, 461-477, 2007.

OLIVEIRA, R.A.G.; LIMA, E.O.; VIEIRA, W.L.; FREIRE, K.R.L.; TRAJANO, V.N.; LIMA, I.O.; SOUZA, E.L.; TOLEDO, M.S.; SILVA-FILHO, R.N. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n.1, p. 77- 82, 2006.

OLIVEIRA, F.Q; GOBIRA, B.; GUIMARÃES, C.; BATISTA, J.; BARRETO, M.; SOUSA, M. Espécies vegetais indicadas na odontologia. **Rev. Bras. Farmacogn.** 17: 466-476. 2007.

OLIVEIRA, I. P.; OLIVEIRA, L. C.; MOURA, C. S. F. T.; JÚNIOR, A. F. L.; ROSA, S. R. A. Cultivo da goiabeira: do plantio ao manejo. **Revista Faculdade Montes Belos**, v. 5, n. 4, Agosto 2012.

OMS. **A crescente ameaça da resistência antimicrobiana. Opções de ação.** Suiça: Organização Mundial da Saúde 2012.

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

OTAÍZA O'R, F. Políticas de control de antimicrobianos en el nivel hospitalario. **Revista chilena de infectología**, v. 19, p. 219-221, 2002.

PANIZZI, L.; CAPONI, C.; CATALANO, S.; CIONI P.L.; MORELLI, I. In vitro antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of *Rubus ulmifolius*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, p. 165-168, 2002.

PEREIRA, V.; DIAS, C.; VASCONCELOS, M.C.; ROSA, E.; SAAVEDRA, M.J. Antibacterial activity and synergistic effects between *Eucalyptus globulus* leaf residues (essential oils and extracts) and antibiotics against several isolates of respiratory tract infections (*Pseudomonas aeruginosa*). **Ind Crops Prod**, v. 52, p. 1-7 2014.

RÍOS, J.L.; RECIO, M.C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **J. Ethnopharmacol**, v. 100, p. 80-84, 2005.

RODRIGUES, C.G.; FERREIRA, P.R.B.; OLIVEIRA, C.S.M.; JÚNIOR, R.R.; VALÉRIO, H.M.; BRAMDI, I.V.; OLIVEIRA, D.A. Antibacterial activity of tanins from *Psidium guineense* Sw.(Myrtaceae). **Journal of Medicinal Plant Research**, v.8, p.1-5, 2014.

ROMEIRO, R.S. **Técnica de microgota para contagem de células bacterianas viáveis em suspensão**. Laboratório de bacteriologia de plantas. Viçosa: UFV, 2007.

ROTMAN, A. Revisión del género *Psidium* en La Argentina (Myrtaceae). **Darwiniana**, 20: 418-444. 1976.

SILVA, G.J.; SOUZA, I.A.; HIGINO, J.S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J.P.; PEREIRA, J.V.; PEREIRA, M.V. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n. 4, p. 572-577. 2007.

SILVA, I.C.A.; ALEIXO, A. A.; ALEIXO, A. M.; FIGUEIREDO, A.P.; LEMUCHI, M.O.; LIMA, L.A.R.S. Análise fitoquímica e atividade antioxidante do extrato hidroetanólico das folhas de *Psidium guajava* L. (goiabeira). **BBR- Biochemistry and Biotechnology Reports**. IV JORNADA ACADÊMICA INTERNACIONAL DE BIOQUÍMICA E I SEMANA CIENTÍFICA DE BIOTECNOLOGIA. Edição especial, v. 2, n.2, p. 76-78, 2013.

SIMÕES, M.; BENNETT, R. N.; ROSA, E. A. S. Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms. **Natural Product Reports**, n. 26; p. 746-757. 2009.

SOARES-SILVA, L.H.; PROENÇA, C.E.B. A new species of *Psidium* L. (Myrtaceae) from southern Brazil. **Botanical Journal of the Linnean Society**. 158: 51-54. 2008.

SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUSA, M.; MAZINE, F.; LUCAS, E. *Myrtaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB24034>>. Acesso em: 17 Set. 2015.

TEIXEIRA, A. B. **Avaliação das atividades antimicrobiana e antioxidante dos óleos essenciais das folhas dos quimiotipos I, II e III de *Lippia alba*(MILL.) N.E. Brown**. 2009. 139f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, 2009.

- TERRONES, M.G.H.; MORAIS, S.A.L.; FERREIRA, S.; SANTOS, D.Q.; NASCIMENTO, E.A.; CHANG, R. Estudo fitoquímico e aleopático do extrato de caule de sucupira-branca (*Pteridon emarginatus*). **Planta Daninha**, v. 25, n. 4 p. 755-762, 2007.
- VAQUERO, M.J.R.; FERNANDÉZ, P.A.A.; NANDRA, M.C.C.; SAAD, A.M.S. Phenolic compound combinations on *Escherichia coli* viability in a meat system. **J. Agric Food Chem**, v. 58, p. 6048- 6052, 2010.
- VENDRUSCOLO, G.S; RATES, S.M.K; MENTZ, L. A. Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Rev. Bras. Farmacogn.** 15: 316-372. 2005.
- VERDI, L.G.; BRIGHENTE, I.M.C.; PIZZOLATTI, M.G. Gênero Baccharis (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, v.28, p.85-94, 2005.
- VIEIRA, R. H. S. F.; RODRIGUES, D. P.; GONÇALVES, F. A.; MENEZES, F. G. R.; ARAGÃO, J. S.; SOUSA, O. V. Microbicidal effect of medicinal plant extracts (*Psidium guajava* LINN. and *Carica papaya* LINN.) upon bacteria isolated from fish muscle and known to induce diarrhea in children. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**. 43 (3): 145 – 148, May - June, 2001.
- Wagner H, Ulrich-Merzenich G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine**, v.16, p.97-110, 2009.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) 2011 – The world medicines situation, 2011. **Tradicional medicines: global situation, issues and challenges**. Geneva. 12p.
- ZAGO, J. A. A., USHIMARU, P. I., BARBOSA, L. N., FERNANDES JUNIOR, A. F. Sinergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobiana sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Rev. Bras. Farmacogn.** 19 (4), 2009.