

**FERNANDA CIOLFI**

POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE EXTRATOS E ÓLEOS  
ESSENCIAIS DE VEGETAIS NÃO TRADICIONAIS SOBRE  
PATÓGENOS DE ORIGEM ALIMENTAR

Dissertação apresentada à Universidade  
Federal de Viçosa, como parte das  
exigências do Programa de Pós-graduação  
em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para  
obtenção do título de “Magister Scientiae”

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2010

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**FERNANDA CIOLFI**

POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE EXTRATOS E ÓLEOS  
ESSENCIAIS DE VEGETAIS NÃO TRADICIONAIS SOBRE  
PATÓGENOS DE ORIGEM ALIMENTAR

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para a obtenção do título de “Magister Scientiae”

Aprovada: 22 de fevereiro de 2010

---

Prof. José Carlos Gomes  
(Co-orientador)

---

Prof. José Antonio Marques Pereira

---

Prof<sup>a</sup> Edimar Aparecida F. Fontes

---

Prof<sup>a</sup> Aurélia Dornelas O. Martins

---

Prof<sup>a</sup> Regina Célia Santos Mendonça  
(Orientadora)

A Deus, por me iluminar e ter dado sabedoria para realização deste trabalho.

Aos meus pais, Florencio e Leoni, pelo amor, incentivo e compreensão.

Ao meu irmão Fernando, pelo apoio.

À minha orientadora, Regina, pelo apoio e confiança em mim depositada,

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

À Deus por estar sempre ao meu lado nos momentos mais difíceis e por ter iluminado meu caminho quando decidi fazer o mestrado.

Aos meus pais, Florencio e Leoni, que sempre me apoiaram e me incentivaram a estudar para progredir e poder ser uma pessoa livre e independente.

Ao meu irmão, Fernando, que de certa forma me incentivava dizendo: “- E aí? Já acabou o bagulho?”

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Regina C. S. Mendonça, que acreditou em mim e me deu a oportunidade de realizar o mestrado. Que me acompanhou, ajudou, orientou, teve a maior paciência do mundo comigo e que sem o seu apoio, carinho e amizade eu não seria capaz dessa vitória.

Aos meus estagiários, Daniel, Micaela e Élide, pelo compromisso com o projeto, dedicação e amizade e que também fazem parte dessa vitória.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Tecnologia de Alimentos pela infra-estrutura e suporte técnico.

Aos servidores da Instituição que sempre tinham meios para nos incentivar, fosse com um sorriso ou com uma palavra amiga. Agradeço em especial o Perereca, vulgo Tomaz, pela ajuda constante nos momentos de apuro com os aparelhos. “Perereca, a bomba de vácuo pifou! Não tem tomada especial para a autoclave! O disjuntor caiu! Precisamos de bicos de gás sobre a bancada! O fluxo da capela não esta funcionando!” E por aí se dava um jeito e continuávamos trabalhando.

Aos amigos que às vezes ajudavam às vezes atrapalhavam com a irritante pergunta: “- Já acabou? Quando é a defesa?”. Agradeço em especial a Neuma, Bia, Evelyn, Conceição e Filogônio pelos momentos agradáveis e de companheirismo. Às amigas mães que me abrigavam quando retornava à Viçosa: Joana e Reny Vera.

A todos que de alguma forma estiveram presentes nessa caminhada especial, meu muito obrigada!

## BIOGRAFIA

FERNANDA CIOLFI, filha de Florencio Ciolfi e Leoni Masiero Ciolfi, nasceu aos quatorze dias do mês de novembro do ano de 1981, na cidade de São Paulo, no estado de São Paulo.

Concluiu o ensino fundamental, em 1995, e o médio em 1998, ambos no Colégio Cardeal Motta, em São Paulo.

Em fevereiro de 2001 ingressou no curso de Medicina Veterinária na Universidade Metodista de São Paulo - UMESP. Em dezembro de 2002 desligou-se da UMESP para dar continuidade ao curso na Universidade Federal de Viçosa - UFV, na qual ingressou em março de 2003. Concluiu a graduação no início de dezembro de 2005.

Em março de 2006 ingressou no programa como aluno especial na UFV e em março de 2007 foi selecionada para o programa de pós-graduação, "*Stricto Sensu*", no Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFV.

Em setembro de 2008 foi aprovada no concurso do Conselho Regional de Medicina Veterinária do Estado de Minas Gerais, com o cargo de fiscal médica veterinária.

Em fevereiro de 2010 foi submetida aos exames finais de defesa de dissertação no curso de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

## ÍNDICE

	LISTA DE TABELAS E QUADROS	vi
	LISTA DE FIGURAS	vii
	LISTA DE ABREVIações	viii
	RESUMO	ix
	ABSTRACT	xi
1.	INTRODUÇÃO	1
2.	REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1.	Patógenos de interesse na indústria de alimentos	3
2.1.1.	<i>Campylobacter jejuni</i>	4
2.1.2.	<i>Escherichia coli O157:H7</i>	6
2.1.3.	<i>Listeria monocytogenes</i>	7
2.1.4.	<i>Enterococcus faecalis</i>	8
2.1.5.	<i>Salmonella</i> Typhimurium	10
2.1.6.	<i>Staphylococcus aureus</i>	12
2.2.	Óleos essenciais e extratos herbáceos: ação antimicrobiana	14
3.	MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1.	Preparação dos extratos vegetais e óleos essenciais com potencial bactericida e virucida	18
3.1.1.	Preparo de extrato alcoólico e hexânico	18
3.1.2.	Preparo de extrato aquoso	18
3.1.3.	Preparo do óleo essencial	19
3.2.	Micro-organismos utilizados no experimento	19
3.2.1.	Ativação das cepas	20
3.3.	Atividade antimicrobiana de extrato de plantas e óleos essenciais	20
3.4.	Análise química do óleo essencial de vegetais	21
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
6.	CONCLUSÕES	45
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

QUADRO 1:	Nomenclatura atual do gênero <i>Salmonella</i> .	10
TABELA 1:	Espécies de plantas utilizadas na obtenção de extratos e óleos essenciais.	19
TABELA 2:	Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) dos extratos aquosos sobre diferentes patógenos.	24
TABELA 3:	Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) dos extratos alcoólicos sobre diferentes patógenos.	26
TABELA 4:	Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) dos extratos hexânicos sobre diferentes patógenos.	29
TABELA 5:	Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) dos óleos essenciais sobre diferentes patógenos.	29

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Cromatograma e tabela de composição dos extratos aquosos de diferentes extratos vegetais (a) folha de jabuticaba; b) folha de taioba; c) folha de capim cidreira; d) folha de palmito; e) semente de goiaba; f) folha de cajá-manga. 36
- Figura 2: Cromatograma e tabela de composição dos extratos alcoólicos de diferentes extratos vegetais (a) folha de taioba; b) folha de jabuticaba; c) folha de cajá-manga; d) folha de *Eucaliptus camaldulensis*; e) folha de *Corymbia citriodora*. 39
- Figura 3: Cromatograma e tabela de composição dos extratos hexânicos de diferentes extratos vegetais (a) folha de *Melaleuca quinquinervia*; b) folha de cravo-da-Índia; c) folha de *Eucaliptus camaldulensis*. 41
- Figura 4: Cromatograma e tabela de composição dos óleos essenciais de diferentes extratos vegetais (a) folha de *Eucaliptus camaldulensis*; b) folha de cravo-da-Índia; c) folha de *Melaleuca alternifolia*; d) folha de *Melaleuca quinquinervia*; e) folha de *Corymbia citriodora*. 44

## LISTA DE ABREVIações

APPCC – Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle  
Aw - Atividade de Água  
BHI - Brain Heart Infusion  
BHT - Butil Hidroxi Tolueno  
CG-MS – Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrofotômetro de Massa  
EAq – Extrato Aquoso  
EAqs – Extratos Aquosos  
EHX – Extrato Hexânico  
EHXs – Extratos Hexânicos  
EOH – Extrato Alcoólico  
EOHs – Extratos Alcoólicos  
eV – Elétron volts  
GRAS - Geralmente Reconhecidos como Seguros  
h – Hora(s)  
kDa – Kilo Dalton  
m/v – Massa/Volume  
MIC – Concentração Inibitória Mínima  
min – Minuto(s)  
MRSA - Meticilina-Resistente  
OE – Óleo Essencial  
OEs – Óleos Essenciais  
ORSA - Oxacilina-Resistente  
rpm – Rotações por Minuto  
v/v – Volume/Volume

## RESUMO

CIOLFI, Fernanda, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2010. **Potencial antimicrobiano de extratos e óleos essenciais de vegetais não tradicionais sobre patógenos de origem alimentar**. Orientadora: Regina Célia Santos Mendonça. Co-orientadores: Paulo César Stringheta e José Carlos Gomes.

As contaminações dos alimentos podem provocar infecções ou intoxicações nos seres humanos e são causadas por diversos agentes, entre os quais estão incluídos diversos micro-organismos. O aparecimento de cepas microbianas resistentes a uma grande variedade de antibióticos tem se tornado um problema para a saúde pública. A principal causa dessa resistência deve-se ao uso excessivo de antibiótico nas rações animais e também ao tratamento indiscriminado de pessoas e animais por prescrição médica e veterinária. Nos últimos anos tem sido crescente a demanda dos consumidores por produtos mais seguros, em vista disto, há cada vez mais a necessidade de se buscar formas alternativas de controle de micro-organismos em alimentos de modo a alcançar este propósito. O presente estudo teve por objetivo geral avaliar o poder antimicrobiano de extratos vegetais frente a patógenos de origem alimentar dando preferência a plantas da biodiversidade de Viçosa, Minas Gerais e subprodutos da indústria de alimentos. Foram utilizadas as seguintes plantas: fruto de *Caryocar brasiliense* (Pequi); folha de *Caryophyllus aromaticus* (Cravo-da-Índia); folha de *Citrus limonium* (Limão); folha de *Corymbia citriodora* (Eucalipto); folha de *Cymbopogon citratus* (Capim Cidreira); folha de *Eucalyptus camaldulensis* (Eucalipto); folha de *Eugenia uniflora* (Pitanga); folha de *Euterpe edulis* (Palmito); semente de *Helianthus annuus* (Girassol); semente de *Mabea fistulifera* (Canudo-de-pito); folha de *Melaleuca alternifolia* (Tea tree); folha de *Melaleuca quinquenervia* (Melaleuca); folha de *Murraya paniculata* (Falsa murta); casca de *Musa X Paradisiaca L.* (Banana nanica); folha de *Myrciaria cauliflora* (Jabuticaba); semente de *Passiflora edulis* (Maracujá); folha e caroço de *Persea gratissima* (Abacate); semente de *Psidium guajava* (Goiaba); folha de *Schinus terebinthifolius* (Aroeirinha); folha de *Spondias dulcis* (Cajá-manga) e folha de *Xanthosoma violaceum* (Taioba) para a obtenção dos extratos. Os extratos foram obtidos por extração em etanol (EOH), hexano (EHX) ou água (EAq) e avaliados quanto ao potencial antimicrobiano frente a diferentes patógenos de origem alimentar. Os resultados obtidos mostraram que os extratos herbáceos que

apresentaram maior ação inibitória tanto para as bactérias gram-negativas quanto as gram-positivas avaliadas, foram: EAq e o EOH de folha de cajá-manga, EOH de folha de taioba e EHX de folha de cravo-da-Índia. Todos os óleos essenciais avaliados mostraram alguma ação inibitória tanto contra os micro-organismos gram-positivos quanto gram-negativos. Nenhum dos EPs mostraram expressivo efeito inibidor. A avaliação da composição química dos extratos estudados permitiu observar diversos constituintes, dentre eles, ácidos graxos (ácido palmítico, oléico, linoléico), alcoóis, aminas, hidrocarbonetos, ésteres, cetonas e ácidos. Na avaliação da composição química dos óleos essenciais foi possível observar a presença de terpenos, aldeídos, alcoóis e fenóis.

## ABSTRACT

CIOLFI, Fernanda, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2010. **Antimicrobial effect of nontraditional extracts and essential oils from plants on foodborne pathogens.** Adviser: Regina Célia Santos Mendonça. Co-Advisers: Paulo César Stringheta and José Carlos Gomes.

Contamination of food can cause infection or intoxication in humans and are caused by several agents, among which are included different micro-organisms. The emergence of microbial strains resistant to a wide variety of antibiotics has become a problem for public health. The main cause is due to the overuse of antibiotics in animal feed and also to the blanket approach of people and animals by veterinary prescription and, respectively. In recent years there has been growing consumer demand for safer products, in view of this, there is increasingly a need to seek alternative ways to control micro-organisms in food in order to achieve this purpose. This study aimed to evaluate the overall antimicrobial power of plant extracts against the foodborne pathogens giving preference to plant biodiversity of Viçosa, Minas Gerais and spinoff of food industry. We used the following plants: fruit of *Caryocar brasiliense* (Pequi); leaves of *Caryophyllus aromaticus* (Glove); leaves of *Citrus Limonium* (Lemon); leaves of *Corymbia citriodora* (Eucalyptus); leaves of *Cymbopogon citratus* (Lemon Balm grass), leaves of *Eucalyptus camaldulensis* (Eucalyptus), leaves of *Eugenia uniflora* (Pitanga); leaves of *Euterpe edulis* (heart of palm); seed of *Helianthus annuus* (Sunflower); seed of *Mabea fistulifera* (Canudo-de-pito); leaves of *Melaleuca alternifolia* (Tea tree); leaves of *Melaleuca quinquenervia* (Melaleuca); leaves of *Murraya paniculata* (False myrtle), bark of *Musa x paradisiaca* L. (Banana nanica); leaves of *Myrciaria cauliflora* (Jaboticaba); leaves of *Passiflora edulis* (passion fruit), leaf and whole *Persea gratissima* (avocado); seed of *Psidium guajava* (Guava), leaves of *Schinus terebinthifolius* (Aroeirinha); leaves of *Spondias dulcis* (Caja-manga) and leaves of *Xanthosoma violaceum* (Taioba) to obtain the extracts. The extracts were obtained by pressing (EP) and extraction in ethanol (EOH), hexane (EHX) or water (EAq). The results showed that the herbal extracts that showed the highest inhibitory effect for both gram-negative and gram-positive evaluated were: EAq and EOH leaves of cajá-manga, EOH leaves of taioba and EHX leaves of clove. All essential oils tested showed some inhibitory action against both micro-gram-positive and gram-negative. None of the EPs showed a

significant inhibitory effect. The evaluation of the chemical composition of the extracts were allowed to observe the various constituents, among them, fatty acids (palmitic acid, oleic acid, linoleic acid), alcohols, amines, hydrocarbons, esters, ketones and acids. In assessing the chemical composition of essential oils was possible to observe the presence of terpenes, aldehydes, alcohols and phenols.

## 1. INTRODUÇÃO

A globalização do fornecimento de alimentos tem apresentado novos desafios para a segurança alimentar e tem contribuído para o problema de saúde pública no tocante à veiculação de patógenos por alimentos. Estimativas da ocorrência de patógenos veiculados por alimentos nem sempre são fáceis pelo fato de poucas doenças serem exclusivamente relacionadas aos alimentos. Embora a gastroenterite aguda não seja sempre causada por alimentos e não é obrigatoriamente que um patógeno veiculado por alimento cause diarreia, os alimentos representam um importante veículo para os patógenos causadores destas enfermidades.

Questões importantes para a segurança alimentar e os desafios relacionados, incluem: a necessidade de controle dos micro-organismos patogênicos devidamente conhecidos, bem como os “novos”, “emergentes” e “mutantes”; o controle da contaminação cruzada; o tratamento e destino corretos para os dejetos dos animais de produção, o acompanhamento dos casos de doenças causadas por alimentos contaminados e a aplicação dos programas de segurança alimentar nas fazendas e granjas. Outras questões e desafios incluem os aditivos alimentares e os resíduos químicos, a rastreabilidade animal, a segurança e a qualidade dos produtos orgânicos e naturais, a necessidade de melhoria e desenvolvimento de testes rápidos e metodologias para a detecção de patógenos de utilização em laboratório e campo, a regulação e a uniformização da fiscalização a nível nacional e internacional, a determinação das responsabilidades por doenças zoonóticas entre as agências de saúde animal e de saúde pública, a implementação completa e rotineira do sistema APPCC, treinamento dos manipuladores de alimentos e educação dos consumidores.

Estes desafios tornam-se mais importante devido às mudanças na produção animal, às mudanças no processamento e distribuição de produtos, ao aumento do comércio internacional; às mudanças nas necessidades dos consumidores e o aumento da preferência por produtos minimamente processados; ao aumento no consumo mundial de carne, ao maior número de consumidores em situação de risco para infecção, e ao aumento do interesse, consciência e análise por parte dos consumidores, mídia e grupos ativistas.

O aparecimento de cepas microbianas resistentes a uma grande variedade de antibióticos tem se tornado um problema para a saúde pública. A principal causa dessa

resistência deve-se ao uso excessivo de antibiótico nas rações animais, utilizados em doses subterapêuticas como fator de crescimento, e também ao tratamento indiscriminado de pessoas e animais por prescrição médica e veterinária. É crescente a demanda dos consumidores por produtos mais seguros, em vista disto, há cada vez mais a necessidade de se buscar formas alternativas de controle de micro-organismos em alimentos de modo a alcançar este propósito.

Os óleos essenciais têm potencial para serem utilizados na indústria alimentícia e farmacêutica. Os componentes naturais podem ser utilizados na preservação de gêneros alimentícios contra bactérias e para combater doenças de origem microbiana. Eles também podem ter valor para aumentar o tempo de prateleira dos gêneros alimentícios funcionando como protetores dos lipídeos altamente insaturados, repondo compostos sintéticos, como o Butil hidroxi tolueno (BHT), e prevenindo dano celular.

Existe um consenso geral sobre a substituição de antibióticos pelo uso de ácidos orgânicos como promotores de crescimento. Embora os óleos essenciais tenham um efeito limitado quando utilizado nessa substituição, estudos mostram que podem ser utilizados sinergicamente aos ácidos orgânicos.

Existe a necessidade de investigar a diversidade da flora brasileira, bem como partes distintas da planta (folhas, cascas, sementes etc.), quanto ao seu potencial antimicrobiano. De modo geral, a literatura mostra que, com relação a esse potencial, são mais avaliados os óleos essenciais provenientes de: botões de cravo-da-Índia (*Caryophyllus aromaticus*), folhas de orégano (*Origanum vulgare*), sementes de tomilho (*Thymus vulgaris*), folhas de louro (*Laurus nobilis*), folhas de *Melaleuca alternifolia* e folhas de eucalipto (*Corymbia citriodora*, *Eucaliptus globus* e *Eucaliptus dives*).

É conveniente pensar que na escolha de um material biológico a ser analisado em busca de compostos ativos e, conseqüentemente, o desenvolvimento de um medicamento ou outro produto, tem-se que levar em consideração as necessidades regionais e mundiais em novos agentes eficientes e seguros enquanto que também sejam preservados a biodiversidade e o meio-ambiente. Portanto, o uso de fontes naturais em saúde deve avaliar quantidades disponíveis, facilidade de acesso, preservação e replantio. Deve-se considerar também a possibilidade de utilizar plantas cultivadas, uma vez que isto permite a produção de material cultivado sob as mesmas condições tornando mais garantida a homogeneidade química, qualitativa e quantitativa. Não existe também um consenso sobre os níveis de inibição aceitáveis para compostos de plantas, quando comparados com antibióticos padrões.

O presente estudo teve por objetivo geral avaliar o efeito antimicrobiano de extratos vegetais frente à patógenos de origem alimentar dando preferência a plantas da biodiversidade de Viçosa, Minas Gerais e subprodutos da indústria de alimentos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Patógenos de importância na indústria de alimentos

Nas últimas décadas, a agroindústria de alimentos tem passado por inúmeras transformações tecnológicas. Paradoxalmente, a despeito das transformações e inovações tecnológicas alcançadas, o número de surtos de toxi-infecções transmitida por alimentos continua sendo uma preocupação para as autoridades de saúde pública e para as próprias agroindústrias. A obtenção de alimentos mais seguros é uma exigência do mercado atual, principalmente pelo reconhecimento do significativo impacto que essas doenças causam, em termos de sofrimento humano e de custos econômicos para a sociedade e para a agroindústria.

Nos últimos anos, alterações demográficas e no estilo de vida dos países desenvolvidos, bem como as preferências dos consumidores provocaram mudanças na formulação e distribuição dos alimentos. Para satisfazer as necessidades de uma população crescente, novas técnicas de processamento, conservação e embalagem estão sendo incorporadas à produção dos alimentos. As redes de distribuição se expandiram, tornaram-se mais centralizadas e complexas, afetando as características epidemiológicas dos surtos e introduzindo novos riscos, possibilitando a contaminação cruzada e o surgimento de novos patógenos. (NASCIMENTO et al, 2007)

As combinações do desenvolvimento tecnológico e das pesquisas e seus resultados permitem concluir que nas condições atuais é essencial controlar o que está sendo consumido como alimento, garantindo a segurança do consumidor. As doenças de origem alimentar causadas por micro-organismos são um grande e crescente problema de saúde pública. A maioria dos países com sistemas de vigilância dos casos de doenças de origem alimentar documentaram aumentos significativos nas últimas décadas na incidência de doenças causadas por micro-organismos em alimentos, incluindo patógenos como *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* entero-hemorrágica, *Listeria* spp. e parasitas tais como *Cryptosporidium*, *Cryptospora* e *Trematodes* (WHO, 2003).

Dados da Organização Mundial de Saúde mostram que cerca de 1,8 milhões de crianças morrem, anualmente, antes de completarem cinco anos. Entre as principais causas associadas

a esses óbitos destacam-se as gastroenterites, muitas vezes provocadas por hábitos alimentares inadequados ou pela ingestão de agentes microbianos presentes em alimentos e água contaminados. Em países industrializados, uma a cada três pessoas pode ser afetada por doenças de origem alimentar, anualmente. Nos EUA, calcula-se que ocorram cerca de 76 milhões de casos anuais, resultando em 350.000 hospitalizações e 9.000 mortes. Os custos estimados são algo em torno de US\$ 35 bilhões. Na Inglaterra e no País de Gales os custos chegam a US\$ 7 milhões e na Austrália US\$ 17,5 bilhões (WHO, 2003).

### **2.1.1. *Campylobacter jejuni***

*Campylobacter jejuni* é um bastonete curvo espiralado, gram-negativo, não esporulado, flagelado, microaerófilo, que requer baixas concentrações de oxigênio (3 a 15) % e altas concentrações de CO<sub>2</sub> (3 a 5) % para seu crescimento e quando duas células formam pequenas cadeias, apresentam arranjo típico em forma de “S” ou “asa de gaivota” (VANDAMME et al, 2005). *Campylobacter* utiliza os produtos do Ciclo de Krebs e aminoácidos para multiplicar, embora não sejam capazes de fermentar carboidratos. Podem ser distinguidos de outras espécies por sua habilidade de hidrolisar hipurato em ácido benzóico e glicina (WHO, 2001).

O habitat natural da maioria das espécies de *Campylobacter* é o intestino das aves e de outros animais homeotérmicos, inclusive o homem e todos os animais inseridos na cadeia alimentar humana, como aves, pássaros selvagens, perus, codornas, patos e avestruzes (NEWELL, 2001).

A produção de toxinas a partir de doenças originadas por *Campylobacter* é muito debatida. Toxinas cólera-semelhante (CLT) têm sido relatadas e podem estar relacionadas à diarreia enterotoxigênica não inflamatória, típica de países em desenvolvimento. Wassenaar (1997) relatou a reatividade imunológica transversal entre CLT, toxina cólera (CT) e toxina termolábil de *E. coli* (LT). Citotoxinas múltiplas, inclusive uma toxina citoletal (CLDT - cytolethal-distending toxin), uma citotoxina hemolítica e toxina shiga também têm sido descritas em *Campylobacter* (WASSENAAR, 1997), de modo que Kerley et al (1997) associaram estas toxinas à taxas de diarreia inflamatória, mas estudos complementares ainda são necessários. Diversas pesquisas têm sido realizadas para entender a patogenicidade de *Campylobacter jejuni* (VAN GERWE et al, 2005; WAGEMAAAR et al, 2005; TAREMI et al, 2006).

Considerados organismos comensais, diferentes espécies de *Campylobacter* são excretadas em grande número no ambiente. Participam da microbiota gastrointestinal de bovinos, suínos, ovinos e animais de estimação domésticos, atuando eficientemente na colonização de aves (HOPKINS et al, 2004). O trato gastrointestinal (TGI) das aves é estéril quando da eclosão, mas no período imediatamente posterior, ocorre rápida colonização por um grande e diversificado número de espécies bacterianas. Existe um equilíbrio na população microbiana do TGI. Parece não haver uma microbiota típica, uma vez que fatores como a

composição do alimento e a presença de patógenos afetam as espécies bacterianas de maneira diferenciada. Embora o ceco tenha pequena participação na recuperação de nutrientes, a população microbiana do TGI não participa diretamente no sistema digestivo das aves (SCHEUERMANN e JÚNIOR, 2005). De modo geral, *Campylobacter* contamina o ambiente e a água potável através das fezes de animais, de aves ou de humanos infetados (FROST; KRAMER; GILLANDERS, 1999; ATTERBURY et al, 2003; SCHERER et al, 2006).

Diversos trabalhos sobre a frequência e distribuição espacial ambiental de *Campylobacter* foram realizados e não são conclusivos (GILLESPIE et al, 2002, NEWELL e FEAMLEY, 2003; CONNERTON et al, 2004; OLIVEIRA, 2006). Para Newell e Feamley (2003) *Campylobacter* está presente em diversos ambientes, principalmente de clima temperado. Tem sido sugerido que a infecção resulta provavelmente da combinação de fatores horizontais tais como: barreiras sanitárias inadequadas, água potável contaminada e transferência por pessoal da granja através das botas e equipamentos (CONNERTON et al, 2004; OLIVEIRA, 2006).

Nichols (2005) examinou os fatores de risco relacionados ao aumento sazonal de infecção por *Campylobacter* no Reino Unido e identificou moscas contaminadas pelo contato com fezes, sobretudo *Musca domestica*, como fontes potenciais de infecção. Isto explicaria, pelo menos parcialmente, o padrão localizado e aleatório das ocorrências da campilobacteriose humana. As moscas são vetores mecânicos importantes para a doença diarréica nos países em desenvolvimento e desempenham um papel secundário na transmissão nos países mais industrializados (ATTERBURY et al, 2005; DINGLE et al, 2005).

As aves domésticas são um reservatório frequente de *Campylobacter* (CONNERTON et al, 2004). Para as condições da avicultura brasileira, Oliveira (2006) detectou 100 % de prevalência de *Campylobacter* spp. em frangos na primeira fase de criação (0 a 21) dias, tanto no sistema convencional como no sistema automatizado de criação, apesar de outros estudos, Stern et al (2001) e Connerton et al (2004), indicarem que o patógeno seria detectável somente a partir de duas a três semanas de idade, mesmo com a eficiente colonização das aves maduras.

A rota principal da infecção por *Campylobacter* em humanos está associada ao consumo de aves contaminadas. A colonização desse micro-organismo é aumentada no abate devido à mistura entre lotes de aves positivos e negativos, levando à contaminação cruzada em larga escala (ATTERBURY et al, 2003). Entretanto, a origem da infecção por *Campylobacter* permanece enganosa devido ao alto grau de diversidade desse micro-organismo e ampla variedade de métodos de identificação utilizados. Não está claro se existem linhagens *Campylobacter* spp. específicas a determinados hospedeiros, assim como a contribuição relativa de cada uma destas fontes para a infecção humana (GILLESPIE et al, 2002; HOPKINS et al, 2004).

A prevalência de *Campylobacter coli* e *C. jejuni* envolvidos nos casos de campilobacteriose humana diferem significativamente de acordo com a espécie animal

hospedeira de *Campylobacter* e conforme as várias fontes ambientais envolvidas no ciclo comensal da bactéria patogênica e do seu hospedeiro (GÜRTLER et al, 2005).

As complicações clínicas da campilobacteriose humana incluem ainda o mega-cólon tóxico e a Síndrome Urêmica Hemolítica (GILLESPIE et al, 2002). Estima-se que  $8 \times 10^2$  células.g<sup>-1</sup> a  $2 \times 10^9$  células.g<sup>-1</sup> causem a doença diarréica (BLACK et al, 1988) e que a dose infectante para causar a infecção em humanos seja de  $5 \times 10^2$  células.g<sup>-1</sup> (ROBINSON, 1981). Na maioria dos casos, o hospedeiro é um portador assintomático, mas que pode ter adquirido imunidade devido a uma infecção anterior por *Campylobacter*. Wassenaar; Geilhausen; Newell (1998) sugerem que aves colonizadas poderiam hospedar contagens de até  $10^{10}$  UFC.g<sup>-1</sup> de conteúdo cecal sem apresentar sintomas, embora níveis mais baixos tenham sido detectados em aves colonizadas naturalmente (SALEHA; IBRAHIM; KAMARZAMAN, 1996).

### **2.1.2. *Escherichia coli* O157:H7**

*Escherichia coli* O157:H7 é um bacilo gram-negativo, sendo que O refere-se ao antígeno somático e H ao antígeno flagelar. A maioria das cepas de *E. coli* O157:H7 podem ser distinguidas das demais *E. coli* por sua incapacidade de fermentar sorbitol rapidamente e por sua falta de produção de β-glucuronidase (DOYLE e SCHOENI, 1984; HAYES et al, 1995).

As primeiras tentativas para subtipar cepas de *E. coli* O157:H7 demonstraram considerável homogeneidade, o que é consistente com o surgimento e propagação de um novo patógeno clone derivado (GRIFFIN e TAUXE, 1991). A maioria das cepas avaliadas durante o início e meados da década de 1980 foram sensíveis à ampicilina, trimetoprim-sulfametoxazol, tetraciclina e quinolonas, e resistentes à eritromicina, metronidazol, e vancomicina (BOOP et al, 1987; RATNAM, et al, 1988; GRIFFIN, 1995). Pesquisadores têm relatado o aumento das taxas de resistência para estreptomicina, sulfisoxazole, tetraciclina e, possivelmente como resultado da prevalência deste organismo em alimentos de animais que recebem estes antibióticos (KIM et al, 1994; SLUTSKER et al, 1997).

Muitos surtos e casos de colite hemorrágica e Síndrome Urêmica Hemolítica causados por *E. coli* O157:H7 foram epidemiologicamente ligados ao consumo de carne moída (PAI et al, 1984; RILEY et al, 1983). O primeiro isolamento partiu de carne moída congelada obtida de um restaurante associado a um surto de colite hemorrágica (WELLS et al, 1983). O gado leiteiro também foi identificado como reservatório de *E. coli* O157:H7, tendo sido o micro-organismo isolado das fezes de animais jovens, de rebanho associado a casos de Síndrome Urêmica Hemolítica em crianças que consumiram leite cru (BORCZYK et al, 1987). Beery; Doyle; Schoeni (1985) mostraram que *E. coli* O157:H7 pode prontamente colonizar o ceco de frangos e ser excretado nas fezes por muitos meses, sugerindo que esta espécie também pode ser um reservatório do micro-organismo.

*E. coli* enterohemorrágica (ECEH) emergiu há algumas décadas como a causa predominante de colite hemorrágica em humanos. Essa doença, com sintoma característico de

diarréia sanguinolenta e cólica abdominal, pode progredir para um sintoma mais severo conhecido como Síndrome Urêmica Hemolítica. A patogenidade de ECEH parece estar associada com fatores de virulência, incluindo a produção citotoxinas (GRIFFIN e TAUXE, 1991). Essas toxinas são coletivamente referidas como verotoxinas ou Shiga-toxina devido à grande semelhança da verotoxina 1 de *E. coli* com a toxina tipo 1 de *Shigella dysenteriae* (KARMALI, 1989). Embora mais de 60 sorotipos de *E. coli* produzam verotoxinas (KARMALI, 1989), o sorotipo O157:H7 é o patógeno predominante no grupo de ECEH e o mais frequentemente associado com relatos de infecção humana a nível mundial (FENG, 1995).

Cepas enterohemorrágicas de *E. coli*, incluindo o sorotipo O157:H7, são importantes patógenos transmitidos por alimentos devido a sua baixa dose infectante, infecções que atingem todos os grupos etários, tolerância incomum a ácido e sua inexplicável associação com ruminantes utilizados na alimentação humana (BUCHANAN e DOYLE, 1997).

Doyle e Schoeni (1987) isolaram *E. coli* O157:H7 de diferentes tipos de carnes vendidas no varejo. De um total de 164 amostras de carne moída, 264 de carne suína e 263 de frango, 6 (3,7 %), 4 (1,5 %) e 4 (1,5 %) continham o patógeno respectivamente, indicando que a bactéria está associada com alimentos de origem animal e não especificamente com carne bovina.

### **2.1.3. *Listeria monocytogenes***

*Listeria* spp. é um cocobacilo gram-positivo, não-esporulado, não-produtor de ácidos, aeróbio ou anaeróbio facultativo, de ampla distribuição ambiental, com caráter ubiqüitário, tendo sido isolado de águas superficiais, de esgotos domésticos, águas residuárias de indústrias de laticínios e de abatedouros, de solos, de insetos, de adubo orgânico e de fezes animais e humanas (MIMS et al, 1995). Pode também ser isolada em diversos produtos alimentícios sejam crus ou após tratamentos térmicos ou químicos (FRANCO e LANDGRAF, 1996; PEREIRA e ROCOURT, 1993)

*Listeria monocytogenes* é patogênica para o homem e diversos animais, e sua ampla distribuição ambiental, é favorecida pela sua capacidade de se desenvolver entre (0 e 44) °C e, embora sua faixa ótima seja entre (30 e 37) °C, pode sobreviver em alimentos congelados. Tolerância a pH extremos de 5 e 9, baixa atividade da água e concentrações de NaCl de 10 % ou até superiores (PEREIRA e ROCOURT, 1993; LANDGRAF, 1997). Este conjunto de características faz com que *Listeria* spp. e *L. monocytogenes*, em especial, sejam um patógeno emergente de grande interesse na área de alimentos. Este fato também explica o destaque que estes micro-organismos vêm recebendo nos últimos 20 anos no controle de qualidade na indústria de alimentos, assim como a possibilidade de causar uma doença grave no consumidor, geralmente fatal quando acomete o sistema circulatório e nervoso central (SCHLECH III, 2000).

A transmissão de *L. monocytogenes* pode ocorrer por via oral, ocular, cutânea, respiratória ou urogenital. As formas de transmissão de animais para os humanos incluem ingestão de alimentos contaminados e contato com animais infectados (PEARSON e MARTH,

1990) e podem ser evitadas de três formas: através do controle do micro-organismo no ambiente de processamento dos alimentos; pelo cuidado com a preparação e escolha dos alimentos no domicílio e, em circunstâncias especiais, pela profilaxia com antibióticos (SCHLECH III, 2000).

Os sintomas associados com *L. monocytogenes* incluem meningoencefalite, dor no corpo, febre, dor de cabeça, septicemia em adultos, pneumonia, endocardite, abscessos localizados, lesões cutâneas pustulosas, conjuntivite, uretrite, e abortos recorrentes. *L. monocytogenes* também pode causar danos cerebrais, retardo mental e mononucleose em alguns casos (PEARSON e MARTH, 1990).

Conter et al (2009) demonstraram que cepas de *L. monocytogenes* isoladas de gêneros alimentícios e dos ambientes de processamento são susceptíveis aos antibióticos comumente utilizados no tratamento de listeriose humana e veterinária. A equipe avaliou a susceptibilidade a 19 antibióticos atualmente utilizados e encontraram que dentre as 120 cepas avaliadas, 14 (11,7 %) apresentaram resistência a pelo menos um antibiótico. Em particular, a resistência a um antibiótico foi mais comum do que resistência múltipla, ou seja, 10 (8,3 %) isolados foram resistentes a um antibiótico, 3 (2,5 %) para dois antibióticos e um (0,8 %) para cinco antibióticos. Resistência à clindamicina foi a mais comum, seguida pela linezolida, ciprofloxacina, ampicilina e rifampicina, sulfa/trimetoprim e, finalmente, vancomicina e tetraciclina. Considerando que *L. monocytogenes* vem apresentando-se resistência aos antibióticos, é importante continuar acompanhando a resistência antimicrobiana emergente deste patógeno para garantir a eficácia do tratamento de listeriose humana (CONTER et al, 2009).

Glass e Doyle (1989) determinaram a sobrevivência de *L. monocytogenes* durante o armazenamento sob refrigeração de vários produtos de carne processada, incluindo presunto, frango em pedaços, peru em pedaços e salame. Concluíram que a taxa de crescimento é altamente dependente do tipo de produto e do pH. O micro-organismo cresceu bem em carnes com pH = 6 e pouco ou nada nos produtos com pH < 5, indicando a importância de prevenir a contaminação após o processamento principalmente de produtos prontos para o consumo.

#### **2.1.4. *Enterococcus faecalis***

Enterococos são bactérias gram-positivas amplamente distribuídas na natureza que podem ter um papel benéfico ou prejudicial nos alimentos. Contribuem diretamente para o amadurecimento e desenvolvimento do sabor de produtos lácteos e outros produtos fermentados (MORENO et al, 2006). Alguns enterococos encontrados nos alimentos podem produzir bacteriocinas que exercem atividade anti-*Listeria*. Também são utilizados como probióticos para melhorar o equilíbrio microbiano do intestino ou como um tratamento de gastroenterites em humanos e animais (FRANZ; HOLZAPFEL; STILES, 1999).

Por outro lado, enterococos são reconhecidos como agentes patogênicos nosocomiais que causam graves infecções, tal como bacteremia, endocardite e infecções do trato urinário (SCHABERG; CULVER; GAYNES, 1991). São patógenos oportunistas e normalmente causam infecções em pacientes que tenham doença subjacente grave ou que sejam imunodeprimidos (MORRISON; WOODFORD; COOKSON, 1997). *Enterococcus faecalis* predomina entre os enterococos isolados de infecções humanas (JETT; HUYCKE; GILMORE, 1994). A causa específica de preocupação é um fator contribuinte para patogênese de enterococos é sua resistência a uma ampla variedade de antibióticos (LECLERCQ, 1997).

A presença de enterococos no trato gastrintestinal dos animais leva a um elevado potencial de contaminação da carne no momento do abate devido ao rompimento dos intestinos quando da evisceração. Estudo conduzido por Knudtson e Hartman (1993) mostrou que suínos abatidos em três diferentes abatedouros continham a média de  $10^4$  a  $10^8$  UFC por  $100 \text{ cm}^2$  da superfície de carcaça, sendo *E. faecium* e *E. faecalis* as espécies predominantes.

*E. faecalis* foi a espécie predominante entre os cocos gram-positivos isolados de amostras de frango coletadas em matadouros (TURTURA e LORENZELLI, 1994). *E. faecalis* está presente naturalmente na microbiota intestinal humana e animal (SCHABERG; CULVER; GAYNES, 1991). É capaz de crescer em condições hostis que normalmente são prejudiciais para o desenvolvimento da maioria dos micro-organismos mesófilos e pode sobreviver em muitos ambientes estressantes (extremas temperaturas, pH e concentrações de sal), o que dificulta os métodos de barreira durante o processamento de alimentos (FLAHAUT; BOUTIBONNES; AUFRAY, 1997).

Enterococos foram sistematicamente isolados de carcaças bovinas, suínas e de aves, em estudo em que se avaliou sua característica de resistência a antibióticos. Possuem resistência intrínseca (mediada por genes localizados no cromossomo) e adquirida (mediada por genes localizados em plasmídeos ou transposons) a vários antibióticos (MURRAY, 1990). Exemplos de resistência intrínseca aos antibióticos incluem a resistência à cefalosporinas,  $\beta$ -lactâmicos, sulfonamidas e baixos níveis de clindamicina e aminoglicosídeos, enquanto exemplos de resistência adquirida incluem resistência a cloranfenicol, eritromicina, clindamicina e altos níveis de aminoglicosídeos, tetraciclina, altos níveis de  $\beta$ -lactâmicos, fluoroquinolonas e de glicopéptidos, tais como a vancomicina (MURRAY, 1990; LECLERCQ, 1997).

A virulência de enterococos não é bem compreendida, mas adesinas, hemolisinas, hialuronidase, substâncias de agregação e gelatinase são supostamente fatores de virulência (FRANZ; HOLZAPFEL; STILES, 1999). Resistência aos antibióticos por si só não pode explicar a virulência de enterococos. A patogênese da maioria das infecções comuns segue uma sequência de eventos que envolvem colonização, adesão e invasão dos tecidos e resistência aos mecanismos de defesa do hospedeiro (FRANZ et al, 2003).

O aquecimento durante a produção de carne processada pode conferir uma vantagem seletiva aos enterococos, pois estes estão entre o grupo das bactérias gram-positivas não

formadoras de esporo mais termotolerantes. Após sobreviver ao aquecimento, tanto *E. faecalis* e *E. faecium* estão envolvidos na deterioração dos produtos cárneos curados, presuntos e carnes em conserva (MAGNUS; MCCURDY; INGLEDEW, 1988).

### 2.1.5. *Salmonella* Typhimurium

*Salmonella* é um gênero da família *Enterobacteriaceae*, caracterizado por ser um bastonete gram-negativo, não esporulado, anaeróbio facultativo, lactose, urease e oxidase negativos. A maioria dos sorovares de *Salmonella* é móvel devido à presença de flagelos peritríquios. O pH de crescimento varia entre 4 e 9, com o ótimo em 7. Sua temperatura ótima de crescimento está entre (35 e 37) °C, e Aw mínima para crescimento é de 0,94 (JAY, 2005).

O gênero *Salmonella*, é classificado atualmente em três espécies: *Salmonella enterica*, *Salmonella bongori* e *Salmonella subterranae*, que foi reconhecida em 2005, como descrito na Quadro 1 (SU e CHIU, 2007). A classificação taxonômica consiste em: gênero, espécie, subespécie e sorovares.

**Quadro 1.** Nomenclatura atual do gênero *Salmonella*.

Espécies	Subespécies	Número de Sorovares
<i>S. enterica</i>	<i>enterica</i> (ou I)	1504
	<i>salamae</i> (ou II)	502
	<i>diarizonae</i> (ou IIIb)	333
	<i>arizonae</i> (ou IIIa)	95
	<i>houtenae</i> (ou IV)	72
	<i>indica</i> (ou VI)	13
	(V)	22
<i>S. bongori</i>		
<i>S. subterranae</i>		
TOTAL		2541

Fonte: adaptado de SU e CHIU, (2007).

Segundo Jay (2005), todos os integrantes do gênero *Salmonella* são considerados patogênicos para humanos. Esse gênero é considerado um dos mais importantes envolvidos em doenças veiculadas pelo consumo de alimentos. Essa bactéria é de grande importância em saúde pública, pelo fato de ser patogênica ao ser humano e representar um dos principais parâmetros de determinação dos padrões microbiológicos, de reconhecimento mundial, para alimentos.

Pelo fato de *E. coli* e *Salmonella* apresentarem, aproximadamente, 90 % de homologia do DNA-DNA, já houve propostas de se agrupar as suas espécies em um único gênero. Por tal fato, acredita-se que ambas as bactérias surgiram de um mesmo ancestral (YAN et al, 2003).

A incidência global de doenças causadas por alimentos é de difícil estimativa. No entanto, no ano de 2000, cerca de 2,1 milhões de pessoas morreram por doenças diarreicas, e em uma alta proporção desses casos a causa é atribuída a alimentos e água contaminados (WHO, 2002).

A prevalência de salmoneloses aumentou significativamente durante as décadas de 80 e 90, em todo mundo (KWANG; LITTLEDIKE; KEEN, 1996). A maioria dos sorovares tem um espectro de hospedeiros amplo e, tipicamente, provocam gastroenterites sem complicações e sem necessidade de tratamento. Em crianças, idosos e indivíduos com o sistema imunológico debilitado ou comprometido, ao contrário, essas infecções podem ser severas. Os sorovares mais importantes dessas salmoneloses em animais e humanos são *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium (SILVA et al, 2007).

Atualmente as salmoneloses ocupam uma das posições mais destacadas no campo da saúde pública em todo o mundo, pois apesar de todo o desenvolvimento tecnológico e da adoção de melhores medidas de higiene, é crescente e relevante o número de casos de salmonelose humana e animal (PENHA et al, 2008).

Nos últimos cinco anos, o Brasil registrou 749 surtos de infecção por *Salmonella*. Desse total, 277 foram causados especificamente pelo consumo de ovos ou maionese caseira contaminados, principais meios de veiculação da bactéria. No Brasil, até o momento, não foi detectado nenhum surto de infecção por *Salmonella* de grande magnitude, como os surtos multi-estaduais, relatados na literatura. Mesmo assim, é preciso manter o trabalho de controle da doença. Os estados onde mais se detectam surtos por *Salmonella* são: o Rio Grande do Sul, o Paraná e São Paulo (LIMA, 2008).

Segundo Leon-Velarde et al (2004), *Salmonella* Typhimurium é uma causa comum de salmoneloses entre humanos e animais em muitos países, sendo responsável por (40 a 70) % dos casos de salmoneloses humanas, apresentando como principais sintomas diarreia, febre, dor de cabeça, náuseas, dor abdominal, vômito e, menos frequentemente, sangue nas fezes.

Em vários países, o aumento de casos esporádicos e de surtos de salmonelose humana está relacionado com o aumento da infecção por *Salmonella* Enteritidis, relacionada ao consumo de carne de aves, ovos e derivados contaminados. O aumento de incidentes nacionais e internacionais envolvendo alimentos contaminados é devido à emergência de *Salmonella* Enteritidis como agente causal de infecções alimentares e à rápida globalização da produção de alimentos (YAN, et al, 2003).

A contaminação de carne crua de frango com *Salmonella* spp. não é usualmente considerada um risco ao consumidor, uma vez que este alimento é próprio para o consumo após cocção. O verdadeiro problema reside no contato de um alimento pronto para o consumo (cozido) com um alimento cru, levando à contaminação cruzada. Os casos mais frequentes de infecção por *Salmonella* spp. reportados em humanos foram em decorrência do manuseio de carne de frango crua e produtos crus, junto com o consumo de carne de frango mal cozida (CAPITA et al, 2003).

tem capacidade de se ligar a sítios específicos na superfície das células epiteliais ou, ainda, são capazes de entrar na célula epitelial, e viver como parasita intracelular. A entrada e a passagem dessa bactéria para as células epiteliais provocam um processo inflamatório do

intestino; há evidências de que uma enterotoxina seja produzida, causando vômitos e diarreia (LIMA, 2008).

O tratamento da infecção por salmonela é feito com hidratação por meio de soro oral. Em alguns casos, também são utilizados antibióticos específicos. Há necessidade de tratamento quando o doente tem desidratação severa ou quando a infecção é extra-intestinal. De modo geral as salmoneloses não devem ser tratadas com antibióticos, pois este procedimento pode prolongar o período de excreção do micro-organismo pelas fezes. É importante destacar que algumas salmonelas já são resistentes a diversos antibióticos, principalmente porque essas drogas podem ser adicionadas às rações para animais (LIMA, 2008).

O aparecimento de sorovares de *Salmonella* spp. resistentes a uma grande variedade de antibióticos tem se tornado um problema para a saúde pública. O uso de antibióticos como promotores de crescimento em frangos de corte e poedeiras até 16 semanas de idade é usual nos Estados Unidos e no Brasil. A partir do ano de 2006, a União Européia impediu o uso de qualquer antimicrobiano como promotor de crescimento animal. Estas medidas foram adotadas com o intuito de contribuir para a redução do surgimento de cepas bacterianas resistentes (KOTTWITZ, 2009).

#### **2.1.6. *Staphylococcus aureus***

As bactérias pertencentes ao gênero *Staphylococcus* são cocos gram-positivos, imóveis, não esporulados, capsulados ou não, anaeróbios facultativos. O gênero *Staphylococcus* é composto por 38 espécies, sendo *S. aureus* o mais envolvido em doenças humanas por produzir grande variedade de fatores de patogenicidade e virulência: estafiloquinases, hialuronidases, fosfatases, coagulases e hemolisinas (JAY, 2005).

Esta espécie é utilizada como um indicador de higiene pessoal e é conhecida por produzir enterotoxinas prejudiciais a saúde humana (SHALE et al, 2005). A presença de *S. aureus* em alimentos está muitas vezes relacionada com a manipulação inadequada por parte do pessoal, que são frequentemente contaminados com este micro-organismo (GUNDOGAN et al, 2005).

Os alimentos que requerem considerável manipulação durante a preparação e que são mantidos sem refrigeração são geralmente implicados em intoxicação alimentar estafilocócica. Assim, os alimentos contaminados com *S. aureus* são potenciais fontes de enterotoxinas quando armazenados a uma temperatura inadequada, em que o micro-organismo pode crescer e sintetizar enterotoxinas (HUANG; WEI; LEE, 2007). Diversas espécies de *Staphylococcus* são capazes de produzir essas toxinas, mas apenas uma espécie, *S. aureus*, está comumente associado com doença de origem alimentar (HUDSON, 2004).

*S. aureus* pode produzir enterotoxinas quando a população excede  $10^5$  células.g<sup>-1</sup>. Este agente produz diversas enterotoxinas (A, B, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, D, E, G, H e I) causadoras de

intoxicações alimentares. No entanto, não são todas as cepas capazes de produzir essas substâncias. A produção destas toxinas depende principalmente da natureza do alimento, dos processos aos quais foram submetidos e da exposição a altas temperaturas (FIGUEROA et al, 2002).

As enterotoxinas são compostos de massa molar entre (27 e 31) kDa resistentes a enzimas proteolíticas e estáveis ao calor, embora a célula vegetativa de *S. aureus* possa ser facilmente destruída por temperaturas elevadas. Algumas toxinas são formadas durante o crescimento exponencial da bactéria, outras são predominantemente formadas quando a bactéria entra em fase estacionária. As condições ambientais para que *S. aureus* seja capaz de produzir toxina são mais restritas do que aquelas necessárias para seu crescimento (SHALE et al, 2005, NEMA et al, 2007).

O período de incubação da doença pode variar de 30 minutos até 8 horas, porém, na maioria dos casos, os sintomas aparecem entre (2 a 4) horas após a ingestão do alimento contaminado com enterotoxinas estafilocócicas pré-formadas. Os efeitos agudos incluem náuseas, vômitos, dor abdominal e diarreia. Estes sintomas diminuem num período de (24 a 48) h, mas a doença pode permanecer durante (7 a 10) dias. Em muitos países as enterotoxinas estafilocócicas são classificados como segunda ou terceira mais comuns agentes causadores de intoxicação alimentar (NEMA et al, 2007).

A incidência de infecções causadas por *S. aureus* adquiridas em comunidades e hospitais tem sido crescente com o aumento de linhagens droga-resistente chamados *S. aureus* meticilina-resistente (MRSA) e *S. aureus* oxacilina-resistente (ORSA). MRSA é um patógeno que se estabelece com facilidade, mesmo em cuidados com a saúde. Anteriormente, limitava-se a hospitais, posteriormente infecções por MRSA foram relatadas em diferentes comunidades. A parte anterior do nariz é o local mais frequentemente colonizado por MRSA (WARREN et al, 2004).

Muitos fatores têm sido apontados por desempenhar importantes papéis no crescimento e produção de enterotoxinas por *S. aureus*, incluindo presença e concentração de sais, pH, temperatura, Aw, exposição ao processamento, competição microbiana, entre outros. Para a indústria de alimentos é importante identificar as condições, em que *S. aureus* é capaz de sobreviver e multiplicar no que diz respeito ao processamento de alimentos, armazenamento e distribuição. *S. aureus* é um organismo muito adaptável e pode sobreviver em uma grande variedade de ambientes (RODE et al, 2007).

O abuso de temperatura é uma das principais causas de intoxicação alimentar por *Staphylococcus*. Esta bactéria é capaz de crescer em uma ampla faixa de temperaturas (7 a 48) °C com crescimento ótimo entre (35 a 37) °C, um intervalo que pode ser frequente em climas quentes (JAY, 2005).

A ausência de estafilococos viável, portanto, não garante que um alimento é seguro. Apesar de estafilococos ser fermentativo e proteolítico, geralmente não produzem odores nos

alimentos ou os fazem parecer deteriorados. A presença da bactéria ou suas toxinas nos alimentos não pode ser detectável por métodos sensoriais (NEWSOME e STEWART, 2004).

Os alimentos, muitas vezes, podem ser preparados em condições inadequadas e armazenados em temperatura ambiente antes de serem comercializados. Desta forma, o tempo decorrido entre o preparo e o consumo dos alimentos é um importante fator a ser considerado quanto ao risco (BAEZA et al, 2009).

É geralmente aceito que *S. aureus* é efetivamente controlado em ambiente de pH 5,3 ou menor. Em pH baixo a capacidade de linhagens enterotoxigênicas produzir enterotoxinas também é reduzida (LINDQVIST; SYLVÉN; VAGSHOLM, 2002).

Uma das características seletivas que torna o gênero *Staphylococcus* sp. favorecido frente às outras bactérias é a qualidade dos organismos serem halotolerantes, podendo representar um perigo adicional, pela falta de micro-organismos competidores. *Staphylococcus* sp. pode tolerar (10 a 20) % de sal. A alta concentração de sal e, em particular os baixos valores  $A_w$  são obstáculos importantes para inibir o desenvolvimento de *S. aureus*. No entanto, o crescimento pode ocorrer em  $A_w = 0,86$  em condições aeróbias ou  $A_w = 0,90$  em condições anaeróbias (NEWSOME e STEWART, 2004).

*S. aureus* é um mau competidor e apresenta maiores riscos em alimentos onde a microbiota normal tem sido destruída ou inibida (RODE et al, 2007). Embora esse organismo compita mal com a microbiota natural dos alimentos é capaz de crescer em valores baixos de  $A_w$ . Estas duas características importantes são refletidas nos tipos de alimentos normalmente associados com doenças de origem alimentar causadas por este organismo: alimentos cozidos e, portanto, sem competidores presentes, e alimentos que contêm elevadas concentrações de sal (HUDSON, 2004).

Nos últimos anos várias contaminações por estafilococos em alimentos que incluem carne vermelha foram implicados em surtos de intoxicação alimentar. Devido à ubiquidade de organismos pertencentes ao gênero *Staphylococcus* em humanos, a contaminação de alimentos em plantas de processamento tem se apresentado como resultado de manipuladores de alimentos como portadores assintomáticos e infectados em lesões cutâneas. O isolamento da mesma estirpe de um alimento e de determinada pessoa, no mesmo período de tempo, ou durante a investigação de um surto, sugere fortemente que o manipulador de alimentos pode ser a fonte de contaminação (SHALE et al, 2005).

## **2.2. Ação antimicrobiana de óleos essenciais e extratos herbáceos**

No passado, a fitoterapia era mais adotada pela população carente da área rural ou urbana, devido à fácil disponibilidade e menores custos. O uso de plantas como uma fonte de medicamentos é predominante em países em desenvolvimento como uma solução alternativa para problemas de saúde e está bem estabelecido em algumas culturas e tradições, especialmente na Ásia, América Latina e África. Devido ao aumento no interesse por produtos

naturais, o uso de plantas medicinais tornou-se relativamente geral. Muitas destas plantas não têm sido estudadas e podem ser avaliadas quanto à ação antimicrobiana, em contraste com plantas nativas da Europa, que já foram exaustivamente estudadas (SHALE; STIRK; VAN STADEN, 1999).

Óleos essenciais (OEs) são geralmente extraídos de porções de plantas por métodos de diluição, usualmente vapor ou hidrodestilação e são misturas variáveis de principalmente terpenóides, especificamente monoterpenos [C10] e sesquiterpenos [C15] e uma variedade de hidrocarbonetos de baixo peso molecular, cetonas, alcoóis, fenóis e aldeídos. Terpenos estão entre os componentes responsáveis pelo uso medicinal, culinário e em fragrâncias de plantas aromáticas e medicinais (DORMAN e DEANS, 2000).

É sabido que a composição química dos OEs de espécies de plantas em particular, pode variar de acordo com a origem geográfica e época de colheita. Ademais, outros fatores, como clima, solo, época e forma de plantio, adubação, uso de agrotóxicos, irrigação, tempo e condições ambientais, proveniência do material da planta (fresco ou seco), técnica de extração, fonte botânica (caule, folhas, frutos etc.), tratamentos culturais e colheita e padrões de variação geográfica (latitudes e longitudes) afetam a composição química dos óleos, podendo provocar alterações na atividade antimicrobiana. É possível então que haja variação na composição entre mesmos grupos de OEs, sendo o suficiente para causar variação no grau de susceptibilidade entre bactérias gram-negativas e gram-positivas (BURT, 2007; NASCIMENTO et al, 2007).

OEs e muitos de seus componentes isolados demonstram ter atividade antimicrobiana "in vitro" contra patógenos veiculados por alimentos e em menor escala nos alimentos. Os compostos fenólicos são os mais ativos e parecem agir principalmente na permeabilidade da membrana (BURT, 2007).

Estudos sobre a atividade antimicrobiana, modo de ação e uso potencial dos OEs têm sido descritos. Esses são promissores na indústria de alimentos e nas diversas criações de interesse ao homem, conferindo proteção contra doenças para o rebanho; reduzindo agentes patogênicos ou deterioradores, atuando como antioxidantes e proporcionando sabor e aroma aos alimentos. Podem ser utilizados para estimular o apetite, a produção de saliva e melhorar a produção de suco gástrico e pancreático (DORMAN e DEANS, 2000).

Deans e Ritchie (1987) testaram 50 OEs disponíveis comercialmente contra 25 gêneros de bactérias e não encontraram diferença na sensibilidade entre organismos gram-negativos e gram-positivos. Por outro lado o estudo conduzido por Koyama et al (1997) ao se avaliarem diversos componentes dos óleos essenciais, observaram habilidade para romper ou penetrar na estrutura lipídica presente em bactérias gram-negativas. Entretanto, em um estudo posterior realizado por Dorman e Deans (2000), utilizando o mesmo método de análise, com os mesmos isolados bacterianos, mas com OE recentemente extraído, foi possível observar que bactérias gram-positivas foram mais susceptíveis aos OEs avaliados do que espécies gram-negativas.

Nakatani (1994) também relatou que bactérias gram-positivas eram mais sensíveis aos OEs do que as gram-negativas.

Delaquis et al (2002) notaram que a fração de OE de coentro (*Coriandrum sativum*) deficiente em compostos fenólicos exibiu forte atividade antimicrobiana, uma observação contrária a suposição de que esses grupos químicos são os principais responsáveis pela atividade antimicrobiana dos OEs. As frações ricas em alcoóis de cadeias longas (C6–C10) e aldeídos foram particularmente ativos contra bactérias gram-positivas. As propriedades antimicrobianas dos alcoóis são conhecidas por aumentarem com a massa molecular do composto (MORTON, 1983). Porém, Huhtanen (1980) encontrou que as concentrações inibitórias mínimas de alcoóis alifáticos diminuía com o aumento da cadeia para *Clostridium botulinum* (gram-positivo).

Smith-Palmer; Stewart; Fyfe (1998) testaram as propriedades antimicrobianas de 21 OEs e constataram que foram eficazes na redução da contagem de *Salmonella* Enteritidis, *C. jejuni*, *E. coli*, *S. aureus*, e *L. monocytogenes*. Os óleos de louro, canela, cravo e tomilho foram os mais eficientes para atividade bactericida. Concentrações variando de (0,05 a 1) % apresentaram atividade bactericida, sendo mais eficazes quando avaliadas a 35 °C.

Smith-Palmer; Stewart; Fyfe (2004) utilizaram OEs de louro, cravo, canela, noz moscada e tomilho para testar a capacidade dos mesmos em influenciarem a produção de enterotoxinas A e B e a-toxina por *S. aureus*. A hemólise devido à a-toxina foi significativamente reduzida após a cultura em presença de todos óleos. Os óleos de louro, canela e cravo diminuíram a produção de enterotoxina A e apenas os óleos de canela e cravo também reduziram a produção de enterotoxina B.

Quando há a pretensão de adicionar OEs nos alimentos é interessante que os mesmos não interfiram ou apenas proporcionem um sabor e aroma suave, preservando as características sensoriais de maior aceitação pelo consumidor. Skandamis e Nychas (2001) analisaram a inibição microbiana, cor e sabor em carne moída utilizando, para tanto, variações na atmosfera de armazenamento e na concentração de OE de orégano. Observaram que em todas as condições de empacotamento, apenas as concentrações de 0,5 % e 1 % OE de orégano foram capazes de inibir o crescimento da microbiota e o sabor, odor e cor da carne moída contendo 1 % de OE foram quase imperceptíveis após o cozimento.

Os extratos de plantas apresentam potencial antimicrobiano, dessa forma podem ser utilizados na indústria alimentícia, bem como no tratamento de doenças infecciosas causadas por micro-organismos resistentes a antibióticos. O efeito sinérgico da associação de antibióticos com extrato de plantas contra bactérias resistentes trazem uma nova opção para o tratamento de doenças infecciosas. Esse efeito permite o uso dos antibióticos quando estes não são mais eficientes por si só durante tratamento terapêutico (NASCIMENTO et al, 2000).

Dickens; Berrang; Cox (2000) testaram a atividade antimicrobiana do extrato herbal Protecta II, com perfil de inibidor bacteriano, durante resfriamento de carcaças de frango. As

carcaças foram deixadas na água do chiller com  $3 \text{ mg.L}^{-1}$  de cloro e outras com 2 % do extrato Protecta II, durante 30 minutos, após esse tempo, as mesmas foram lavadas e a água de rinsagem foi analisada com relação a aeróbios totais, coliformes, *E. coli* e *Campylobacter* e confrontadas com um controle. Os autores encontraram reduções de um ciclo logarítmico nas contagens dos micro-organismos avaliados, quando usaram água clorada ( $3 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e 2 ciclos logarítmicos quando houve adição de 2 % do extrato.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Preparação dos extratos vegetais e óleos essenciais com potencial bactericida**

As plantas foram obtidas na região de Viçosa localizada na Zona da Mata do Estado de Minas Gerais, a 20°45' de Latitude Sul e 42°51' de Longitude Oeste e a altitude de 649 m (JÚNIOR et al, 2004). A Tabela 1 relaciona as espécies vegetais com o tipo de solvente utilizados para obtenção de extratos e óleos essenciais de diferentes partes vegetais.

##### **3.1.1. Preparo de extrato alcoólico e hexânico**

Para obtenção do extrato alcoólico (EOH) e hexânico (EHX), adotou-se a metodologia proposta por Silveira (1997). As folhas ou sementes foram trituradas em liquidificador, em velocidade máxima e a seguir foram pesados aproximadamente 300 g em erlenmeyers. Os erlenmeyers foram deixados sob agitação em shaker horizontal (Certomat® MO II) a 120 rpm durante 4 h com os respectivos solventes: etanol (Impex®) e hexano (Merck®), em quantidade suficiente para cobrir as folhas; não mais que 1:2 (m/v). Procedeu-se a filtração (papel de filtro Qualy®) e ao filtrado adicionou-se 8 g de sulfato de sódio (Merck®). Procedeu-se a nova filtração. O solvente foi evaporado em rotavapor (Fisatom) a 140 rpm, pressão média de 600 mmHg, por um período médio de 1 h e temperatura da água do banho a 55 °C.

Todos os extratos foram armazenados em frasco âmbar sob refrigeração (4 °C).

##### **3.1.2. Preparo de extrato aquoso**

Para obtenção do extrato aquoso (EAq), adotou-se a metodologia descrita acima, porém sem a adição de sulfato de sódio. As folhas ou sementes foram trituradas em liquidificador, em velocidade máxima e a seguir foram pesados aproximadamente 300 g em erlenmeyers. Os erlenmeyers foram deixados sob agitação em shaker horizontal (Certomat® MO II) a 120 rpm durante 4 h com água destilada em quantidade suficiente para cobrir as folhas; não mais que 1:2 (m/v). Procedeu-se com a filtração (papel de filtro Qualy®). O solvente foi evaporado em rotavapor (Fisatom) a 140 rpm, pressão média de 600 mmHg, por um período médio de 1 h ou o tempo necessário para redução de 50 % do volume inicial com temperatura da água do banho-maria a 65 °C.

Todos os extratos foram armazenados em frasco âmbar sob refrigeração (4 °C).

**Tabela 1.** Espécies de plantas utilizadas na obtenção de extratos e óleos essenciais:

Espécie	Nome comum	Tipo de extrato/Solvente extrator	Parte vegetal utilizada
<i>Caryophyllus aromaticus</i>	Cravo-da-Índia	Hexano, Etanol, Água, Óleo essencial	Folha
<i>Citrus limonium</i>	Limão galego	Etanol	Folha
<i>Corymbia citriodora</i>	Eucalipto	Etanol, Água	Folha
<i>Cymbopogon citratus</i>	Capim Cidreira	Etanol	Folha
<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	Eucalipto	Etanol, Hexano, Óleo essencial	Folha
<i>Eugenia uniflora</i>	Pitanga	Etanol, Óleo essencial	Folha
<i>Euterpe edulis</i>	Palmito	Etanol	Folha
<i>Helianthus annuus</i>	Girassol	Hexano	Semente
<i>Mabea fistulifera</i>	Canudo-de-pito	Hexano, Etanol, Água	Semente
<i>Melaleuca alternifolia</i>	Tea tree	Etanol, Água, Óleo essencial	Folha
<i>Melaleuca quinquenervia</i>	Melaleuca	Hexano, Etanol, Óleo essencial	Folha
<i>Murraya paniculata</i>	Falsa murta	Etanol	Folha
<i>Musa X Paradisiaca L.</i>	Banana nanica	Etanol, Água	Casca
<i>Myrciaria cauliflora</i>	Jabuticaba	Etanol, Água	Folha
<i>Passiflora edulis</i>	Maracujá	Hexano	Semente
<i>Persea gratissima</i>	Abacate	Hexano, Etanol, Água	Folha
		Etanol	Semente
<i>Psidium guajava</i>	Goiaba	Hexano	Semente
<i>Schinus terebinthifolius</i>	Aroeirinha	Hexano, Etanol, Água	Folha
<i>Spondias dulcis</i>	Cajá-manga	Etanol, Água	Folha
<i>Xanthosoma violaceum</i>	Taioba	Etanol, Água	Folha

### 3.1.3. Preparo do óleo essencial

Para obtenção do óleo essência (OE), adotou-se a metodologia proposta por Franco et al (2005). Trezentos gramas de folhas foram trituradas em liquidificador, em velocidade máxima, e a seguir transferidas para balão de fundo redondo. Procedeu-se à extração por aquecimento por resistência elétrica – hidrodestilação em aparelho de *Clevenger* (Tecnal Equipamentos para Laboratórios Ltda.) durante quatro horas. O óleo foi coletado com pipeta de *Pasteur* e transferido para frasco âmbar.

Todos os óleos essenciais foram armazenados em frasco âmbar sob refrigeração (4 °C).

### 3.2. Micro-organismos utilizados no experimento

No presente estudo foram utilizadas cepas de *Campylobacter jejuni* (NCTC 12662), obtida do Laboratório Central de Saúde Pública (CPHL – Colindale, Londres, UK) e cepas de *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 43895), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028) e *Staphilococcus*

*aureus* (ATCC 6538) obtidas da Fundação Oswaldo Cruz. Os grupos de patógenos foram separados de acordo com sua característica de coloração de gram.

### 3.2.1. Ativação das cepas

Todas as cepas foram ativadas três vezes antes de serem usadas no experimento. A ativação foi realizada considerando as temperaturas ótimas de crescimento para cada micro-organismo. A primeira ativação foi feita em caldo Brain Heart Infusion (BHI - Oxoid), seguido de crescimento em ágar BHI (Oxoid) para verificar pureza do material. As cepas foram cultivadas em caldo BHI por duas vezes para completar a ativação.

As condições de incubação foram:

- Para *C. jejuni*: incubação a 42 °C em microaerofilia (85 % N<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub> e 5 % O<sub>2</sub>) obtida com auxílio de anaerobac (Probac do Brasil) em jarra de anaerobiose, por 48 h;

- Para *E. coli* O157:H7, *E. faecalis*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium e *S. aureus*: incubação a (35 a 37) °C em aerobiose por 24 h.

Após ativação, o número de UFC.mL<sup>-1</sup> de cada micro-organismo foi obtido por contagem direta em placa e posteriormente foram feitas diluições, de modo a padronizar a concentração do inóculo a ser usado em análises posteriores para 10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>.

### 3.3. Atividade antimicrobiana de extrato de plantas e óleos essenciais

A atividade antibacteriana, dos extratos vegetais e óleos essenciais, foi analisada pelo método de diluição em placa (JORGENSE, TURNIOGE e WASHINGTON, 1999) modificado por Hammer; Carson; Riley (1999) que incorporaram ao ágar BHI uma concentração final de 0,5 % (v/v) de Tween-20 (Sigma), depois de autoclavado para aumentar a solubilidade do extrato e óleo essencial. Foi determinada a concentração inibitória mínima (MIC) com base no documento M7-A4 do NCCLS (NCCLS, 1997) usando-se concentração inicial do extrato/OE de 2 % (v/v) em relação ao meio de crescimento e diluições progressivas seriadas do extrato/OE (fator de diluição 2) de 1,0; 0,5; 0,25 e 0,13 %. O ágar contendo diferentes concentrações de extrato e de OE foram vertidas em placas de Petri deixadas “over-night” e posteriormente foram feitas as estrias com o patógeno já ativado. A intensidade de crescimento do patógeno foi avaliada em relação a um referencial arbitrário baseado em uma escala de crescimento em ausência de extrato vegetal (3 - crescimento intenso; 2 - crescimento moderado; 1 - pouco crescimento; 0 - sem crescimento).

Os resultados foram analisados de forma descritiva avaliando o efeito do extrato/OE usado sobre a intensidade de crescimento do patógeno alvo frente ao controle negativo. As análises foram feitas em triplicata e em três repetições.

### 3.4. Análise química do óleo essencial de vegetais

Os óleos essenciais e extratos que tiveram ação antimicrobiana foram analisados por cromatografia gasosa de alta resolução, acoplada a espectrometria de massas (CG-MS) para a identificação de compostos nos extratos das plantas selecionadas.

As condições operacionais para aquisição do espectro de massas para a identificação dos constituintes dos extratos e óleos essenciais foram as seguintes: Cromatógrafo a gás acoplado a um detector de massas (CG-MS) Shimadzu, modelo QP 5050A. Utilizou-se coluna capilar DB-5MS, 0,25 mm de diâmetro interno, 30 m de comprimento e 0,25 µm de filme líquido. A temperatura do injetor foi de 280 °C, “split” 1:30. A quantidade de amostra injetada foi de 2 µL. O gás de arraste utilizado foi o gás Hélio, 1 mL.min<sup>-1</sup> constante. A temperatura do “transferline” foi de 280 °C e a modulação axial de 4 V. A intensidade da ionização foi de 70 eV e o modo de ionização utilizado foi por impacto de elétrons. A programação de temperatura do forno foi com temperatura inicial de 60 °C, elevação de temperatura a 280 °C na razão de 2 °C por minuto permanecendo por 30 minutos, perfazendo um tempo total de corrida 140 minutos. O espectro de massas de cada um dos componentes dos óleos essenciais e extratos foram analisados e comparados aos espectros contidos no acervo da biblioteca Wiley 7.0 (VALENTE, 2005).

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, não foi possível obter os extratos com todos os solventes e métodos usados. Além do baixo rendimento de extração para alguns substratos havia também a presença de ceras e parafinas, as quais se apresentavam de difícil solubilização no momento de incorporação ao ágar, mesmo quando acrescentado o agente surfactante – Tween 20. Por esta razão foram avaliados apenas aqueles que apresentaram extração e solubilização adequadas para as análises. De acordo com Delaquis et al (2002), o método de extração interfere no resultado dos testes de ação inibitória devido à baixa solubilidade do óleo e sua considerável volatilidade, podendo haver perda das frações mais leves, as quais podem ser primordiais para a inibição dos micro-organismos.

A avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos não aquosos e óleos essenciais são dificultadas devido às suas propriedades físicas, pois seus componentes são pouco solúveis em água e isso limita sua homogeneização com o meio de cultura, o que impede a determinação visual da eficácia antimicrobiana do óleo devido à interferência da dissolução insuficiente dos componentes avaliados. Diferentes estratégias são utilizadas para contornar o problema, tal como a adição de surfactantes (Tween) ao caldo ou ágar. A dispersão do extrato ou óleo essencial usualmente resulta em uma suspensão turbida que pode dificultar a leitura dos halos de inibição ou para determinação de MIC (HOOD; WILKINSON; CAVANAGH, 2003; CARSON; HAMMER; RILEY, 2006).

O uso de agente surfactante é necessário para facilitar a dispersão do extrato vegetal através do meio de cultura. É possível que ocorra interferência do agente emulsificante na susceptibilidade da bactéria ao extrato vegetal pela possível influência deste sobre o crescimento bacteriano e/ou sobre a permeabilidade da membrana celular (NASCIMENTO et al, 2007). Desta forma foram feitos, preliminarmente, testes (dados não mostrados) para verificar se o Tween 20, agente surfactante usado, na concentração de 0,5 % causaria alguma inibição bacteriana. Os resultados mostraram que não havia interferência no crescimento dos diferentes patógenos avaliados.

A remoção dos solventes: etanol e hexano evitou que sua atividade bacteriostática mascarasse propriedades antimicrobianas do extrato vegetal. A sua ausência pode ser comprovada ao não ser detectado na análise de espectrometria de massa dos extratos analisados. Tanto a remoção do etanol e do hexano quanto a redução do volume de água,

foram feitos em condições brandas de temperatura para evitar degradação de substâncias termolábeis presentes no extrato fluido. Mesmo assim, os dados encontrados no presente estudo mostram que terpenos extremamente voláteis como alfa-pineno (ponto de ebulição igual a 33 °C) e beta-pineno (ponto de ebulição igual a 36 °C) não foram encontrados nos EAqs nem EOHs, mas foram encontrados nos OEs de tea-tree, melaleuca e EHX de melaleuca, por exemplo.

Os métodos de avaliação de atividade antimicrobiana comumente usados são o de difusão em disco, difusão utilizando cavidades feitas no ágar, diluição em ágar e diluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima. Os resultados obtidos por cada um desses métodos podem diferir devido a fatores como as variações entre os testes, a exemplo do crescimento microbiano, exposição de micro-organismos ao óleo, a solubilidade do óleo ou de seus componentes, o uso e quantidade de emulsificador (HAMMER; CARSON; RILEY, 1999; HOOD; WILKINSON; CAVANAGH, 2003; NASCIMENTO et al, 2007). Na presente pesquisa, ensaios preliminares foram feitos para testar três metodologias para determinação da MIC: diluição do extrato ou OE em caldo contendo a cultura ativada, discos embebidos em extrato ou OE colocado em placas com a cultura em fase de crescimento e estrias da cultura em ágar contendo extrato ou OE. O método que nos permitiu determinar a MIC sem a dúvida no resultado foi este último, conforme descrito no item 3.3 de Materiais e Métodos.

Na Tabela 2 encontram-se os resultados de concentração inibitória mínima obtidos quando se usou extrato aquoso de diferentes partes vegetais.

Os EAqs de cravo-da-Índia, eucalipto (*C. citriodora* e *E. camaldulensis*), pitanga, canudo-de-pito, tea-tree, melaleuca, falsa murta, banana nanica, abacate (caroço e folha) e aroeirinha não apresentaram efeito inibitório até a concentração de 2 % frente a todos micro-organismos avaliados. Os EAq de folha de limão galego e semente de goiaba não apresentaram efeito inibitório contra nenhuma das bactérias gram-negativas.

Dentro do grupo de bactérias gram-negativas, *Salmonella* Typhimurium mostrou-se pouco sensível a todos os extratos, *C. jejuni* mostrou ser inibido pelos EAq de folha de capim cidreira, folha de jabuticaba, folha de cajá-manga e folha de taioba e *E. coli* apresentou sensibilidade frente ao EAq de folha de capim cidreira, folha de palmito, folha de cajá-manga e folha de taioba.

No grupo das bactérias gram-positivas *L. monocytogenes* e *E. faecalis* apresentaram sensibilidade ou inibição de crescimento quando avaliadas com EAq de folha de limão galego, folha de capim cidreira, folha de palmito, semente de goiaba, folha de cajá-manga, folha de taioba. *S. aureus* mostrou-se pouco sensível aos EAq avaliados.

O EAq de folha de cajá-manga destacou-se pelo fato de causar inibição tanto nas bactérias gram-negativas quanto as gram-positivas avaliadas. *Salmonella* Typhimurium e *S. aureus* foram os micro-organismos menos sensíveis a concentração de 2 % dos extratos avaliados.

**Tabela 2.** Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) dos extratos aquosos sobre diferentes patógenos.

ESPÉCIE DE PLANTA	NOME COMUM	FONTE	Bactérias gram-negativas															Bactérias gram-positivas														
			<i>Campylobacter jejuni</i>					<i>Salmonella Typhimurium</i>					<i>Escherichia coli</i> O157:H7					<i>Listeria monocytogenes</i>					<i>Enterococcus faecalis</i>					<i>Staphylococcus aureus</i>				
			Concentração usada (%)					Concentração usada (%)					Concentração usada (%)					Concentração usada (%)					Concentração usada (%)					Concentração usada (%)				
			2	1	0,5	0,25	0,13	2	1	0,5	0,25	0,13	2	1	0,5	0,25	0,13	2	1	0,5	0,25	0,13	2	1	0,5	0,25	0,13	2	1	0,5	0,25	0,13
<i>Caryophyllus aromaticus</i> L.	Cravo-da-Índia	Folha	3	-	-	-	-	2	-	-	-	-	3	-	-	-	-	2	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-
<i>Citrus limonium</i>	Limão galego	Folha	3	-	-	-	-	2	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	0	1	-	-	-	2	-	-	-	-
<i>Corymbia citriodora</i>	Eucalipto	Folha	2	-	-	-	-	2	-	-	-	-	2	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-
<i>Cymbopogon citratus</i>	Capim cidreira	Folha	0	0	3	-	-	2	-	-	-	-	0	1	-	-	-	0	2	-	-	-	1	-	-	-	-	2	-	-	-	-
<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	Eucalipto	Folha	2	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-	2	-	-	-	-	3	-	-	-	-
<i>Eugenia uniflora</i>	Pitanga	Folha	2	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-
<i>Euterpe edulis</i>	Palmito	Folha	2	-	-	-	-	2	-	-	-	-	0	0	0	3	-	0	1	-	-	-	0	0	0	2	-	2	-	-	-	-
<i>Mabea fistulifera</i> Mart	Canudo-de-pito	Semente	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-	1	-	-	-	-	2	-	-	-	-	2	-	-	-	-	3	-	-	-	-
<i>Melaleuca alternifolia</i>	Tea-tree	Folha	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-	2	-	-	-	-	3	-	-	-	-
<i>Melaleuca quinquenervia</i>	Melaleuca	Folha	3	-	-	-	-	2	-	-	-	-	3	-	-	-	-	2	-	-	-	-	2	-	-	-	-	3	-	-	-	-
<i>Murraya paniculata</i>	Falsa murta	Folha	3	-	-	-	-	2	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-
<i>Musa X Paradisiaca</i> L.	Banana nanica	Casca	2	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-	2	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-
<i>Myrciaria cauliflora</i>	Jaboticaba	Folha	0	0	1	-	-	2	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-
<i>Persea gratissima</i>	Abacate	Caroço	2	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-
		Folha	2	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-	2	-	-	-	-
<i>Psidium guajava</i>	Goiaba	Semente	2	-	-	-	-	2	-	-	-	-	2	-	-	-	-	1	-	-	-	-	0	0	0	2	-	2	-	-	-	-
<i>Schinus terebinthifolius</i>	Aroeirinha	Folha	3	-	-	-	-	2	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-	2	-	-	-	-	2	-	-	-	-
<i>Spondias dulcis</i>	Cajá-manga	Folha	0	0	0	2	-	0	3	-	-	-	0	0	3	-	-	0	3	-	-	-	0	0	3	-	-	0	3	-	-	-
<i>Xanthosoma violaceum</i>	Taioba	Folha	0	0	0	1	-	1	-	-	-	-	0	1	-	-	-	0	0	1	-	-	0	1	-	-	-	1	-	-	-	-

Legenda: (3) crescimento intenso; (2) crescimento moderado; (1) pouco crescimento; (0) não houve crescimento e (-) concentrações não avaliadas.

Quanto ao EAq de folha de palmito não foram encontrados dados na literatura sobre sua composição química e nem uma possível ação antimicrobiana para suas folhas que possa corroborar ou discordar dos dados obtidos neste estudo. Pode-se observar que a inibição observada para *E. coli*, *L. monocytogenes* e *E. faecalis* e o pouco crescimento observado para *C. jejuni*, *Salmonella* e *S. aureus* merecem uma investigação mais aprofundada.

Na Tabela 3 encontram-se os resultados de MIC obtidos quando se usou extrato alcoólico de diferentes partes vegetais. Os EOH de folha de cravo-da-Índia, folha de limão galego, folha de capim cidreira, folha de palmito, folha de tea-tree, folha de melaleuca, folha de falsa murta, casca de banana nanica e abacate (caroço e folha) não apresentaram efeito inibitório até a concentração de 2 % frente aos micro-organismos avaliados. *Salmonella* Typhimurium e *S. aureus* foram os micro-organismos que se apresentaram mais resistentes frente aos diferentes EOH avaliados.

Dentro do grupo de bactérias gram-negativas, os EOHs que apresentaram algum efeito inibitório foram folha de eucalipto (*C. citriodora* e *E. camaldulensis*), folha de pitanga, semente de canudo-de-pito, folha de jabuticaba, folha de aroeirinha, folha de cajá-manga e folha de taioba. Para o grupo de bactérias gram-positivas, os EOHs que apresentaram algum efeito inibitório foram folha de eucalipto (*C. citriodora*), folha de cajá-manga e folha de taioba. Os EOHs de folha de cajá-manga e folha de taioba destacaram-se pelo fato de causarem inibição tanto em bactérias gram-negativas quanto gram-positivas avaliadas.

Nascimento et al (2000) avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos vegetais, dentre eles cravo-da-Índia, goiaba e capim-cidreira, frente a micro-organismos sensíveis e resistentes a antibióticos, bem como o possível efeito sinérgico da associação entre antibióticos e extratos vegetais e o maior potencial antimicrobiano verificado foi o EOH de cravo em botão que inibiu 64,2 % dos micro-organismos, e 83,3 % dos micro-organismos resistentes a antibióticos. No presente estudo, foi observado que tanto os EAqs e o EOH de cravo-da-Índia, não foram capazes de inibir nenhum dos micro-organismos avaliados, já o EHX inibiu tanto o grupo de bactérias gram-positivas, quanto gram-negativas. Ainda neste mesmo estudo os autores constataram que a fração hidro-alcoólica do extrato de capim cidreira foi capaz de inibir *S. aureus*, *Salmonella Choleraesuis* e *Klebsiella pneumoniae* e o extrato hidro-alcoólico de folha de goiaba inibiu *S. aureus* e *Candida albicans*. Em contrapartida, no presente trabalho o EAq de capim cidreira não inibiu *Salmonella* Typhimurium e *S. aureus*, e o EOH do vegetal não apresentou inibição frente aos micro-organismos estudados. O EAq de semente de goiaba não foi capaz de inibir as bactérias gram-positivas e apresentou MIC entre 0,5 e 0,25 % para *E.*

**Tabela 3.** Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) dos extratos alcoólicos sobre diferentes patógenos.

ESPÉCIE DE PLANTA	NOME COMUM	FONTE	Bactérias gram-negativas															Bactérias gram-positivas														
			<i>Campylobacter jejuni</i>					<i>Salmonella Typhimurium</i>					<i>Escherichia coli</i> O157:H7					<i>Listeria monocytogenes</i>					<i>Enterococcus faecalis</i>					<i>Staphylococcus aureus</i>				
			Concentração usada (%)					Concentração usada (%)					Concentração usada (%)					Concentração usada (%)					Concentração usada (%)					Concentração usada (%)				
			2	1	0,50	0,25	0,13	2	1	0,50	0,25	0,13	2	1	0,50	0,25	0,13	2	1	0,50	0,25	0,13	2	1	0,50	0,25	0,13	2	1	0,50	0,25	0,13
<i>Caryophyllus aromaticus</i> L.	Cravo-da-Índia	Folha	1	-	-	-	-	3	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	2	-	-	-	-	2	-	-	-	-
<i>Citrus limonium</i>	Limão galego	Folha	3	-	-	-	-	2	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-	2	-	-	-	-
<i>Corymbia citriodora</i>	Eucalipto	Folha	0	3	-	-	-	3	-	-	-	-	0	1	-	-	-	3	-	-	-	-	0	1	-	-	-	3	-	-	-	-
<i>Cymbopogon citratus</i>	Capim cidreira	Folha	2	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-
<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	Eucalipto	Folha	0	0	3	-	-	3	-	-	-	-	1	-	-	-	-	2	-	-	-	-	1	-	-	-	-	3	-	-	-	-
<i>Eugenia uniflora</i>	Pitanga	Folha	2	-	-	-	-	3	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-
<i>Euterpe edulis</i>	Palmito	Folha	2	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-
<i>Mabea fistulifera</i> Mart	Canudo-de-pito	Semente	1	-	-	-	-	3	-	-	-	-	2	-	-	-	-	3	-	-	-	-	2	-	-	-	-	3	-	-	-	-
<i>Melaleuca alternifolia</i>	Tea-tree	Folha	2	-	-	-	-	2	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-
<i>Melaleuca quinquenervia</i>	Melaleuca	Folha	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-	1	-	-	-	-	2	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-
<i>Murraya paniculata</i>	Falsa murta	Folha	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-
<i>Musa X Paradisiaca</i> L.	Banana nanica	Casca	2	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-	2	-	-	-	-	3	-	-	-	-
<i>Myrciaria cauliflora</i>	Jaboticaba	Folha	0	0	0	0	1	2	-	-	-	-	0	1	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	2	-	-	-	-
<i>Persea gratissima</i>	Abacate	Caroço	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-
		Folha	2	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-
<i>Schinus terebinthifolius</i>	Aroeirinha	Folha	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-	0	3	-	-	-	3	-	-	-	-	1	-	-	-	-	3	-	-	-	-
<i>Spondias dulcis</i>	Cajá-manga	Folha	0	0	3	-	-	1	-	-	-	-	0	0	3	-	-	0	3	-	-	-	0	0	2	-	-	1	-	-	-	-
<i>Xanthosoma violaceum</i>	Taioba	Folha	0	0	1	-	-	2	-	-	-	-	0	1	-	-	-	0	1	-	-	-	0	1	-	-	-	2	-	-	-	-

Legenda: (3) crescimento intenso; (2) crescimento moderado; (1) pouco crescimento; (0) não houve crescimento e (-) concentrações não avaliadas.

*faecalis*, fraca inibição frente a *L. monocytogenes* e nenhuma inibição contra *S. aureus*; já o EHX não apresentou inibição frente aos micro-organismos avaliados.

Ushimaru et al (2007) avaliaram a atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos metanólicos de algumas plantas medicinais, dentre elas: folhas de goiaba e de capim-cidreira e botões de cravo-da-Índia, frente a *E. coli*, *Salmonella* Typhimurium, *S. aureus* e *Enterococcus* sp., sendo o extrato de cravo-da-Índia o mais eficaz contra as bactérias avaliadas, especialmente contra *S. aureus*. Os demais extratos apresentaram atividade inibitória semelhante.

Os resultados contraditórios podem ser devido ao uso de plantas frescas e não secas, etanol e não metanol como solvente, folhas e não botões (cravo-da-Índia), sementes e não folhas (goiaba) como os autores citados (Nascimento et al, 2000; Ushimaru et al, 2007).

Michelin et al (2005) testaram alguns extratos, dentre eles o de folha de taioba, frente a cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27583) e *Staphylococcus aureus* (ATCC29213) e 11 bactérias resistentes a antibióticos isoladas em ambiente hospitalar: *S. aureus*, *E. coli* (numeradas como 6.2 e 1.9c); *Proteus* sp; *P. aeruginosa* (numerada como 6.4) e *Enterobacter* sp. O EOH de taioba destacou-se por inibir 53,3 % dos micro-organismos avaliados (*E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* 6.4, *Enterobacter* sp e *S. aureus*) e, na concentração de 50 mg.mL<sup>-1</sup>, inibiu tanto bactérias gram-positivas quanto gram-negativas. Os resultados encontrados na presente pesquisa foram muito semelhantes sendo que com o EAq houve inibição frente a todos os micro-organismos estudados, destacando-se o efeito frente a *C. jejuni*, o qual apresentou MIC entre 0,5 e 0,25 %. Já com o EOH, foi possível observar um efeito de inibição menor, no geral, com MIC entre 2 e 1 % e ausência de inibição frente a *Salmonella* Typhimurium e *S. aureus* (MIC entre 0,25 e 0,13 % frente a *C. jejuni*), EHX de folha de *M. quinquinervia* (MIC entre 0,5 e 0,25 % frente a *C. jejuni*, *E. coli* O157:H7 e *E. faecalis* e entre 0,25 e 0,13 % frente a *L. monocytogenes*). O EOH e EHX de abacate não apresentaram efeito inibitório até a concentração de 2 % frente aos micro-organismos avaliados.

Quanto a jabuticaba, é uma fruta nativa brasileira e pouco se conhece sobre os constituintes químicos nas diversas partes do fruto, principalmente, em relação aos compostos bioativos. Alguns poucos estudos com a jabuticabeira (sem distinguir as espécies) relatam a presença de taninos, cianidina 3glicosídeo, peonidina 3glucoside, aglicona, altos níveis de ácido ascórbico ácido, delphinidina 3glicosídeo (REYNERTSON et al, 2006; MACEDO-COSTA et al, 2009; SOUZA, 2007).

Reynertson et al (2006) verificaram a presença de taninos hidrolisáveis nas folhas coletadas nas quatro estações e de traços de flavonóides nas folhas coletadas durante o inverno e durante o verão, porém não foram observados para as folhas coletadas na

primavera e no outono. Do mesmo modo também não foi observada a presença de alcalóides, antraquinonas, glicosídeos cardiotônicos e saponinas.

Em estudo realizado por Macedo-Costa et al (2009) concluiu-se, que o extrato de jabuticaba produziu uma atividade bacteriostática *in vitro* sobre as bactérias do biofilme dental, o que sugeria a utilização dessa substância como meio alternativo e economicamente viável para o controle de afecções em Odontologia. Em estudo conduzido por Souza (2007) foram encontrados elevados teores de fenóis totais nos extratos das folhas de jabuticaba. Extratos polares da folha mostraram baixa atividade antimicrobiana e os EOH apresentaram resultados mais expressivos de atividade anti-séptica. Os resultados da presente pesquisa mostram que o EOH de folha de jabuticaba apresentou maior atividade antimicrobiana frente aos patógenos avaliados, resultado este que está de acordo com os encontrados por Souza (2007).

Vuddhakul et al (2007) e Adonizio et al (2006) observaram que o EOH de capim cidreira não teve atividade antimicrobiana frente a *E. coli* e *S. aureus*. No presente trabalho foi encontrado o mesmo efeito com o EOH de capim cidreira, porém o EAq de capim cidreira inibiu *C. jejuni* (MIC entre 0,5 e 1 %), *E. coli* e *L. monocytogenes* (MIC entre 2 e 1 %), obtendo-se fraca inibição frente a *E. faecalis* e nenhuma inibição de *Salmonella* Typhimurium.

Meléndez e Capriles (2006) utilizaram EOH de folha de cajá-manga e não encontraram atividade antimicrobiana contra *E. coli* e *S. aureus*. Diferentemente destes resultados no presente estudo observou-se fraca inibição de *S. aureus* e uma inibição mais forte de *E. coli* O157:H7, *E. faecalis*, *L. monocytogenes* e *C. jejuni* crescidos em meio com EOH e além disto quando se estudou o EAq de folha de cajá-manga observou-se inibição de todos os micro-organismos avaliados.

Observam-se na Tabela 4 os resultados de MIC obtidos para inibição microbiana quando se usou extrato hexânicos de diferentes partes vegetais. Os EHX de semente de girassol, semente de maracujá, folha de abacate e semente de goiaba não apresentaram efeito inibitório até a concentração de 2 % frente aos micro-organismos avaliados. Para o grupo de bactérias gram-negativas, os EHX que apresentaram algum efeito inibitório foram: semente de canudo-de-pito, folha de aroeirinha, folha de *E. camaldulensis*, folha de melaleuca. Tanto o EHX de folha de *E. camaldulensis* quanto o de *M. quinquinervia* não mostraram efeito inibidor contra *Salmonella* Typhimurium e *S. aureus*. Por outro lado, o EHX de folha de cravo-da-Índia inibiu tanto o grupo de bactérias gram-positivas, quanto gram-negativas.

Salazar et al (2007) testaram extratos alcoólicos e hexânicos de algumas espécies das famílias: *Myristicaceae*, *Piperaceae*, *Magnoliaceae* e *Lauraceae* frente a *Mycobacterium tuberculosis*. Nenhuma das espécies de plantas utilizadas foi a mesma que as utilizadas no

**Tabela 4.** Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) dos extratos hexânicos sobre diferentes patógenos.

ESPÉCIE DE PLANTA	NOME COMUM	FONTE	Bactérias gram-negativas															Bactérias gram-positivas														
			<i>Campylobacter jejuni</i>					<i>Salmonella Typhimurium</i>					<i>Escherichia coli</i> O157:H7					<i>Listeria monocytogenes</i>					<i>Enterococcus faecalis</i>					<i>Staphylococcus aureus</i>				
			Concentração usada (%)					Concentração usada (%)					Concentração usada (%)					Concentração usada (%)					Concentração usada (%)									
			2	1	0,50	0,25	0,13	2	1	0,50	0,25	0,13	2	1	0,50	0,25	0,13	2	1	0,50	0,25	0,13	2	1	0,50	0,25	0,13	2	1	0,50	0,25	0,13
<i>Caryophyllus aromaticus</i> L.	Cravo-da-Índia	Folha	0	0	0	0	2	0	0	0	0	3	0	0	0	1	-	0	0	0	1	-	0	0	0	2	-	0	0	0	2	-
<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	Eucalipto	Folha	0	0	0	1	-	3	-	-	-	-	0	0	2	-	-	0	1	-	-	-	0	0	2	-	-	3	-	-	-	-
<i>Helianthus annuus</i> L.	Girassol	Semente	2	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-
<i>Mabea fistulifera</i> Mart	Canudo-de-pito	Semente	1	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-
<i>Melaleuca quinquenervia</i>	Melaleuca	Folha	0	0	0	1	-	3	-	-	-	-	0	0	0	1	-	0	0	0	0	1	0	0	0	2	-	3	-	-	-	-
<i>Passiflora edulis</i>	Maracujá	Semente	2	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-	2	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-
<i>Persea gratissima</i>	Abacate	Folha	2	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-
<i>Psidium guajava</i>	Goiaba	Semente	2	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-	3	-	-	-	-	2	-	-	-	-	3	-	-	-	-
<i>Schinus terebinthifolius</i>	Aroeirinha	Folha	1	-	-	-	-	3	-	-	-	-	1	-	-	-	-	2	-	-	-	-	2	-	-	-	-	2	-	-	-	-

Legenda: (3) crescimento intenso; (2) crescimento moderado; (1) pouco crescimento; (0) não houve crescimento e (-) concentrações não avaliadas.

**Tabela 5.** Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) dos óleos essenciais sobre diferentes patógenos.

ESPÉCIE DE PLANTA	NOME COMUM	FONTE	Bactérias gram-negativas															Bactérias gram-positivas														
			<i>Campylobacter jejuni</i>					<i>Salmonella Typhimurium</i>					<i>Escherichia coli</i> O157:H7					<i>Listeria monocytogenes</i>					<i>Enterococcus faecalis</i>					<i>Staphylococcus aureus</i>				
			Concentração usada (%)					Concentração usada (%)					Concentração usada (%)					Concentração usada (%)					Concentração usada (%)									
			2	1	0,50	0,25	0,13	2	1	0,50	0,25	0,13	2	1	0,50	0,25	0,13	2	1	0,50	0,25	0,13	2	1	0,50	0,25	0,13	2	1	0,50	0,25	0,13
<i>Caryophyllus aromaticus</i> L.	Cravo-da-Índia	Folha	0	0	0	0	2	0	0	0	2	-	0	0	0	1	-	0	0	0	1	-	0	0	0	1	-	0	0	0	0	2
<i>Corymbia citriodora</i>	Eucalipto	Folha	0	0	0	0	2	3	-	-	-	-	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	3	-	-	-	-
<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	Eucalipto	Folha	0	0	0	1	-	0	1	-	-	-	0	0	1	-	-	0	0	3	-	-	0	0	1	-	-	0	1	-	-	-
<i>Melaleuca alternifolia</i>	Tea-tree	Folha	0	0	0	2	-	0	0	0	1	-	0	0	0	1	-	0	0	0	3	-	0	0	0	2	-	0	0	0	2	-
<i>Melaleuca quinquenervia</i>	Melaleuca	Folha	0	0	0	1	-	2	-	-	-	-	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2	0	0	0	1	-	1	-	-	-	-

Legenda: (3) crescimento intenso; (2) crescimento moderado; (1) pouco crescimento; (0) não houve crescimento e (-) concentrações não avaliadas.

presente estudo, porém no presente experimento foram utilizadas outras espécies de *Myristicaceae*, tal como: cravo-da-Índia, pitanga, jabuticaba, goiaba, melaleuca; e da família *Lauraceae* o abacate. De modo geral, os extratos do presente estudo, da família *Myristicaceae*, apresentaram fraca ou nenhuma inibição até a concentração de 2 % frente aos micro-organismos avaliados, exceto EOH de folha de pitanga (MIC entre 1 e 0,5 % frente a *C. jejuni*) e EOH de folha de jabuticaba.

Na Tabela 5 encontram-se os resultados de MIC obtidos para inibição microbiana quando se usou óleos essenciais (OE) de diferentes partes vegetais. Os grupos de patógenos foram separados de acordo com a sua característica de coloração gram. Todos os óleos essenciais avaliados mostraram alguma ação inibitória tanto contra os micro-organismos gram-positivos quanto gram-negativos.

Neste trabalho foram avaliados dois OEs de eucalipto: *C. citriodora* e *E. camaldulensis*. O OE de *C. citriodora* apresentou uma forte inibição (MIC entre 0,25 e 0,13 %) frente a *C. jejuni*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *E. faecalis*, mas não apresentou inibição contra *Salmonella* Typhimurium e *S. aureus*, divergindo em parte dos resultados encontrados por Delaquis et al (2002) que encontraram inibição também para *Salmonella* Typhimurium e *S. aureus*. Já o OE de *E. camaldulensis*, avaliado no presente estudo foi capaz de inibir todos os micro-organismos avaliados, resultado semelhante ao encontrado pelos referidos autores. Esta divergência pode ser explicada pela diferença dos componentes químicos entre as espécies mesmo quando provenientes da mesma família (BURT, 2007; NASCIMENTO et al, 2007).

Estanislau et al (2001) testaram a atividade antibacteriana de OEs de cinco espécies de *Eucalyptus*, dentre eles *Corymbia citriodora*, e encontraram atividade contra *S. aureus* (ATCC 6538), inibição de *E. coli* O:158 e inibição de *Salmonella* Choleraesuis (ATCC 10708). na presente pesquisa não foi encontrado inibição frente à *Salmonella* Thyphimurium e *S. aureus* (MIC maior que 2 %), porém o referido óleo apresentou MIC entre 0,25 e 0,13 % para os demais micro-organismos avaliados.

A partir do início de 1990, diversas pesquisas avaliando o uso do OE de tea-tree como agente antimicrobiano foram citados na literatura científica. Apesar de haver ainda certo grau de discrepância entre os métodos utilizados nos diferentes estudos, os MICs frequentemente relatados foram relativamente semelhantes. Uma ampla gama de bactérias já foram avaliadas para a sua susceptibilidade ao OE de tea-tree. Embora a maioria das bactérias tenham mostrado sensibilidade ao OE de tea-tree em concentrações de 1 % ou menos, MICs maiores do que 2 % são relatados para micro-organismos tais como: micrococcos e estafilococos comensais de pele, *E. faecalis* e *P. aeruginosa* (HAMMER; CARSON; RILEY, 1996; BANNES-MARSHALL; CAWLEY; PHILLIPS, 2001). OE de tea-tree

é na maioria das vezes bactericida, embora possa ter efeito bacteriostático em concentrações menores (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006). No presente experimento foi encontrado que o OE de tea-tree foi capaz de inibir todos os micro-organismos avaliados com MIC relativamente baixo (entre 0,5 e 0,25 %).

A atividade do OE de tea-tree contra bactérias antibiótico-resistentes tem recebido muita atenção por parte dos pesquisadores, principalmente com relação a *S. aureus* metilicina-resistente (MRSA). Carson; Hammer; Riley (2006) examinaram 64 MRSA isolados da Austrália e Reino Unido e encontraram MIC de 0,25 % para os isolados da Austrália e 0,312 % para os isolados do Reino Unido. Outras pesquisas já tinham revelado resultados semelhantes (ELSOM e HIDE, 1999; MAY et al, 2000; HADA et al, 2001).

É extremamente difícil generalizar o modo de ação dos extratos vegetais e óleos essenciais em bactérias e leveduras. Geralmente bactérias gram-positivas são consideradas mais sensíveis do que as gram-negativas devido a sua menor complexidade de membrana. Bactérias gram-negativas possuem uma membrana externa que proporciona para a bactéria uma superfície hidrofílica, devido à presença de moléculas de lipopolissacarídeo. Pequenos solutos hidrofílicos são capazes de passar pela membrana externa através de abundantes porinas fornecendo canais hidrofílicos trans-membranais, enquanto que a parede externa serve como uma barreira evitando a entrada de macromoléculas e compostos hidrofóbicos, sendo por esta razão que bactérias gram-negativas são relativamente resistentes a antibióticos hidrofóbicos e drogas tóxicas (NIKAIDO, 1996).

Em geral, ultrapassar a membrana externa é um pré-requisito para qualquer soluto exercer atividade bactericida em bactérias gram-negativas. Por conseguinte, é válido analisar os compostos antimicrobianos presentes em plantas frente a bactérias gram-negativas diretamente nos alimentos, pois os compostos lipofílicos de baixo peso molecular, apesar de sua limitada solubilidade em água, podem sofrer a influência do alimento e serem capazes de penetrar na célula microbiana.

Kotzekidou; Giannakidis; Boulamatsis (2008) testaram extratos e óleos essenciais em chocolate, dentre eles OE de banana, de limão e de capim cidreira e observaram ação bactericida para *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* e *S. aureus*.

Os ácidos graxos presentes, principalmente, nos extratos lipofílicos podem ser os responsáveis pela atividade antimicrobiana encontrada nas plantas desse estudo. Pesquisas indicam que ácidos graxos insaturados de cadeia longa, como o ácido oléico e ácidos graxos saturados de cadeia média, como o ácido láurico, são responsáveis pela atividade antimicrobiana do leite humano e bovino, inativando tanto bactérias gram-positivas quanto gram-negativas. A presença de ácidos graxos saturados e insaturados nos extratos sugere que esses podem estar contribuindo para a atividade antimicrobiana observada contra as

cepas gram-positivas e, especialmente, contra as cepas gram-negativas de acordo com o estudo realizado por Silveira et al (2005).

O conhecimento da constituição fitoquímica dos extratos e OEs das plantas é importante porque constitui uma ferramenta a ser utilizada no controle de qualidade e permite avaliar e estudar atividades biológicas e/ou farmacológicas que uma determinada planta e seu extrato possam apresentar. A avaliação da composição química dos extratos estudados permitiu observar diversos constituintes, dentre eles, ácidos graxos (ácido palmítico, oléico, linoléico), alcoóis, aminas, hidrocarbonetos, ésteres, cetonas e ácidos. Na avaliação da composição química dos óleos essenciais foi possível observar a presença de terpenos, aldeídos, alcoóis e fenóis.

Tanto os extratos quanto os OEs usualmente contêm mais de um componente com ação antimicrobiana e podem ser potencialmente utilizados como agentes naturais para a preservação de alimentos, por terem componentes geralmente reconhecidos como seguros – GRAS, como por exemplo: ácido linoléico, tocoferol, limoneno, linalol e eugenol (FDA, 2010).

A atividade antimicrobiana dos OEs está atribuída ao número de pequenos terpenóides e compostos fenólicos que, devido a sua característica lipofílica, acumulam na membrana bacteriana causando depleção de energia (CONNER, 1993).

Extratos vegetais e OEs podem apresentar diferentes modos de ação contra as cepas bacterianas, tais como: interferência na membrana celular, tendo como consequência um aumento da permeabilidade e perda de constituintes celulares; danos nas enzimas envolvidas na produção de energia celular e síntese de componentes estruturais e destruição ou inativação de material genético (KIM; MARSHALL; WEI, 1995). Em geral, o mecanismo de ação é a alteração da membrana citoplasmática, interrompendo a força próton-motora, o fluxo de elétrons, transporte ativo e coagulação do conteúdo das células (SIKKEMA; DE BONT; POOLMAN, 1995).

Terpenos, hidrocarbonetos como hexatriaconteno e nonadecano (encontrados no EOH de jaboticaba), alfa-pineno (encontrado no EHX de melaleuca, OE de tea-tree), trans-cariofileno (encontrados no EHX e OE de melaleuca), dl-limoneno, trans-ocimeno (encontrados no OE de cravo-da-Índia), gama-terpineno (encontrados no OE de cravo-da-Índia e OE de tea-tree), alfa-terpineno (encontrados no OE de cravo-da-Índia, OE de tea-tree e OE de melaleuca), beta-pineno e limoneno (encontrados no OE de tea-tree) podem inativar enzimas essenciais, que reagem com a atividade da membrana celular, ou atrapalhar a funcionalidade do material genético, produção de energia e síntese de componentes estruturais de acordo com estudos realizados por Celikel e Kavas (2008).

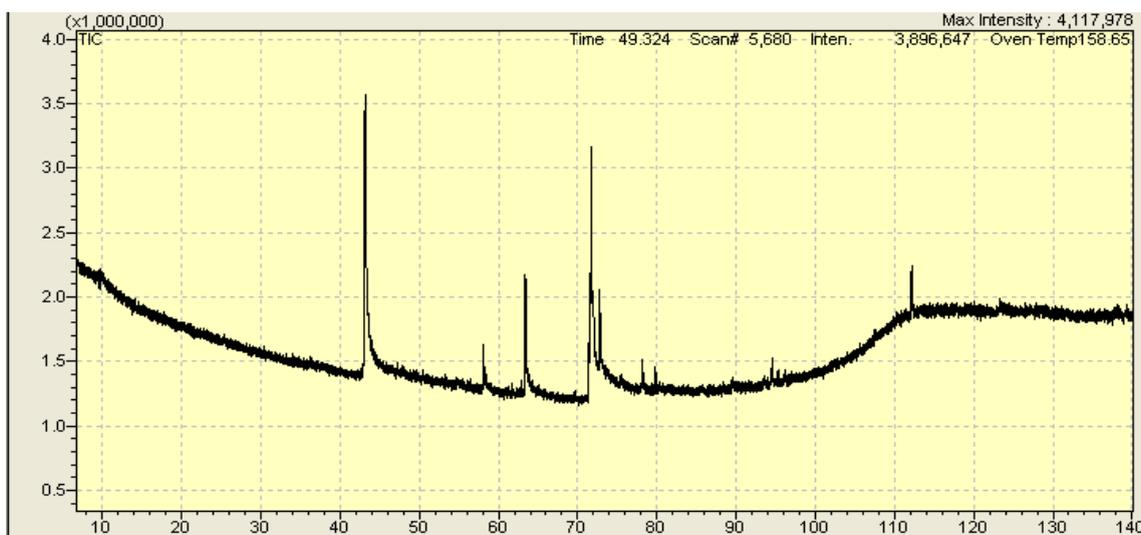
Pelczar; Chan; Krieg (1988) constataram que a alta atividade dos componentes fenólicos pode ser explicada em termos de substituição do alquil no núcleo fenólico, que é conhecido por aumentar a atividade antimicrobiana de fenóis. Principalmente em micro-organismos gram-negativos, sugerindo que a alquilação influencia a sensibilidade das bactérias de acordo com sua classificação gram. Na análise da composição química dos extratos do presente experimento foi possível observar a presença de fenóis no EOH de folha de jabuticaba (alfa-tocoferol), no EHX de melaleuca e também em seu OE (1,8-cineol), no OE de *E. camaldulensis* (1,8-cineol) e no OE de cravo-da-Índia (cavicol e eugenol), o que pode estar contribuindo para a ação inibitória destes extratos.

Alcoóis são conhecidos por possuir atividade bactericida ao invés de atividade bacteriostática contra células vegetativas. Os alcoóis terpenóides potencialmente atuam como agentes de desnaturação protéica, solventes ou agentes desidratantes (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1988). Foi possível encontrar compostos dessa classe no EAq de folha de taioba (farnesol), EOH de folha de taioba (3-metil butanol), no EOH de folha de jabuticaba (3-metil-1- butanol e farnesol), no EHX de melaleuca (veridiflorol), no OE de folha de *E. camaldulensis* (3-butan-1-ol, nerol), no OE de cravo-da-Índia (linalol), no OE de tea-tree (4-terpineol) e no OE de melaleuca (3-ciclohexano-1-metanol e veridiflorol).

Pelczar; Chan; Krieg (1988) sugerem que o grupo aldeído, principalmente formaldeído e glutaraldeído, conjugado a um carbono de ligação dupla é um arranjo muito eletronegativo, sugerindo que o aumento da eletronegatividade aumenta a atividade antibacteriana. Esses compostos eletronegativos podem interferir nos processos biológicos que envolvem transferência de elétrons e reagir com os componentes nitrogenados de suma importância, como por exemplo, proteínas e ácidos nucleicos e, portanto, inibem o crescimento de micro-organismos (DORMAN e DEANS, 2000).

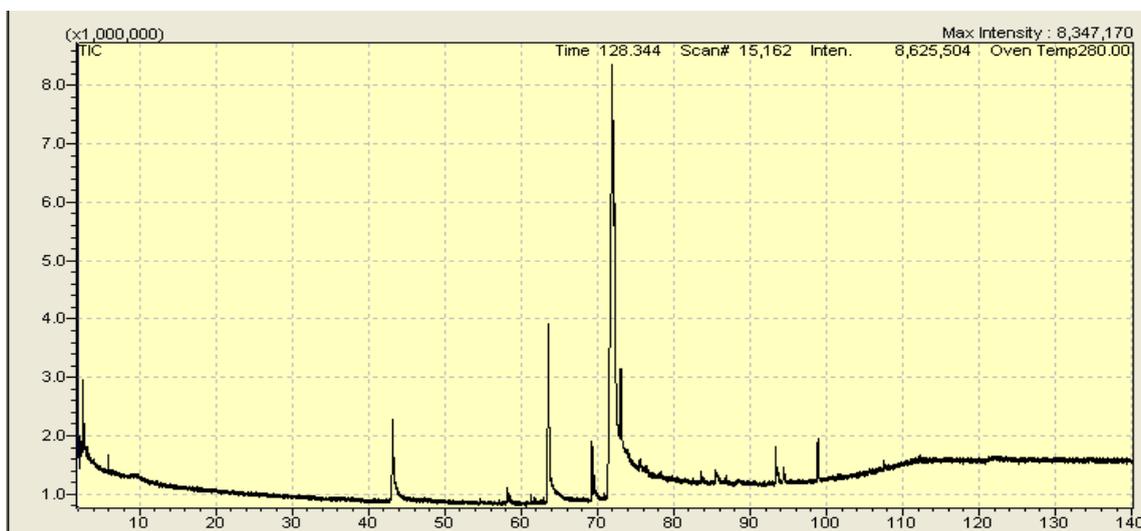
As Figuras 1, 2, 3 e 4 estão relacionadas com os extratos/óleos essenciais que apresentaram ação inibitória sobre os patógenos avaliados e mostram os cromatogramas, as tabelas com tempo de retenção e os compostos encontrados para os respectivos extratos vegetais na análise por espectrofotometria de massa.

a) Folha de *Myrciaria cauliflora*



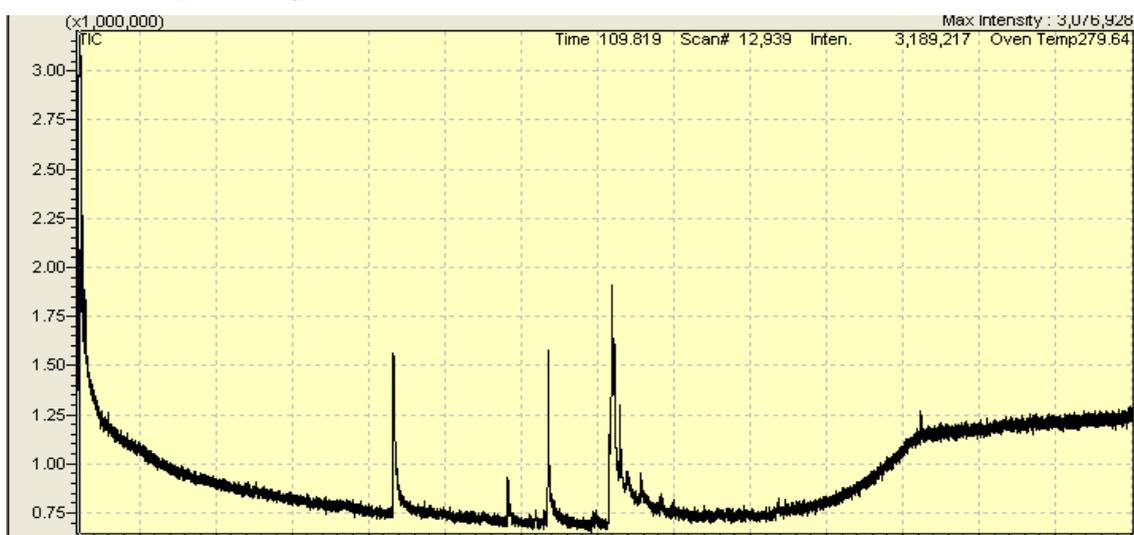
Tempo (min)	Composto	Fórmula
42,6	1,2-Benzeno dicarboxílico	$C_{12}H_{14}O_4$
62,3	Lixose	$C_5H_{10}O_5$
71,7	Hexil éster ácido 9-octadecenóico	$C_{24}H_{46}O_2$
72,8	1,2,2-Trimetilciclopropilamina	$C_6H_{13}N$

b) Folha de *Xanthosoma violaceum*



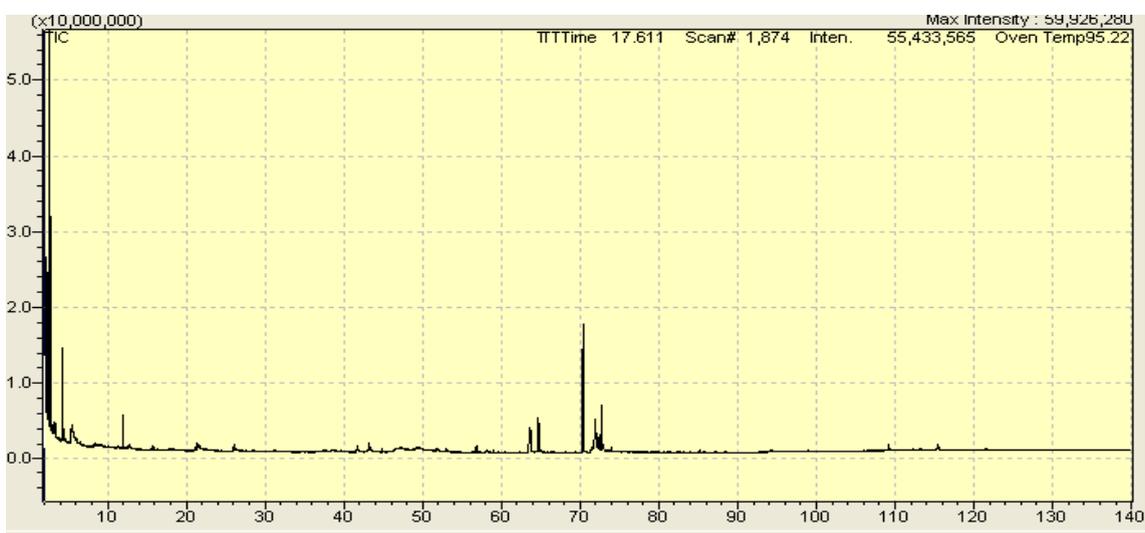
Tempo (min)	Composto	Fórmula
43.4	Butil ftalato	$C_{16}H_{22}O_4$
63,5	Ácido palmítico	$C_{16}H_{32}O_2$
71,8	Ácido linoleico	$C_{18}H_{32}O_2$
73,0	Ácido oleico	$C_{18}H_{34}O_2$
99,8	Farnesol	$C_{15}H_{26}O$

c) Folha de *Cymbopogon citratus*



Tempo (min)	Composto	Fórmula
42,5	1,2-Benzeno dicarboxílico	$C_{12}H_{14}O_4$
63,5	Ácido palmítico	$C_{16}H_{32}O_2$
71,8	Ácido linoleico	$C_{18}H_{32}O_2$
73,0	Ácido oleico	$C_{18}H_{34}O_2$

d) Folha de *Euterpe edulis*



Tempo (min)	Composto	Fórmula
2,1	Acetol	$C_3H_6O_2$
2,6	3-Metil-butanol	$C_5H_{12}O$
12	3-Hexeno1	$C_6H_{12}O$
63,6	Dodecanamido	$C_{16}H_{33}NO$
64,7	Ácido palmítico	$C_{16}H_{32}O_2$
70,1	Fitol	$C_{20}H_{40}O$
72,3	Ácido oleico	$C_{18}H_{34}O_2$

e) Semente de *Psidium guajava*



Pela metodologia utilizada, não houve condições de dizer que os dois primeiros picos possam estar associados a algum composto. A metodologia utilizada não foi adequada para essa amostra.

f) Folha de *Spondias dulcis*



Tempo (min)	Composto	Fórmula
2,5	Alanina etil éster	$C_5H_{11}NO_2$
3,7	Furfural	$C_5H_4O_2$
6,0	2(5H)-Furanona	$C_4H_4O_2$
14,1	Nitroso-3-pirrolina	$C_4H_6N_2O$

Figura 1: Cromatograma e tabela de composição dos extratos aquosos de diferentes extratos vegetais (a) folha de *Myrciaria cauliflora*; b) folha de *Xanthosoma violaceum*; c) folha de *Cymbopogon citratus*; d) folha de *Euterpe edulis*; e) semente de *Psidium guajava*; f) folha de *Spondias dulcis*.

a) Folha de *Xanthosoma violaceum*



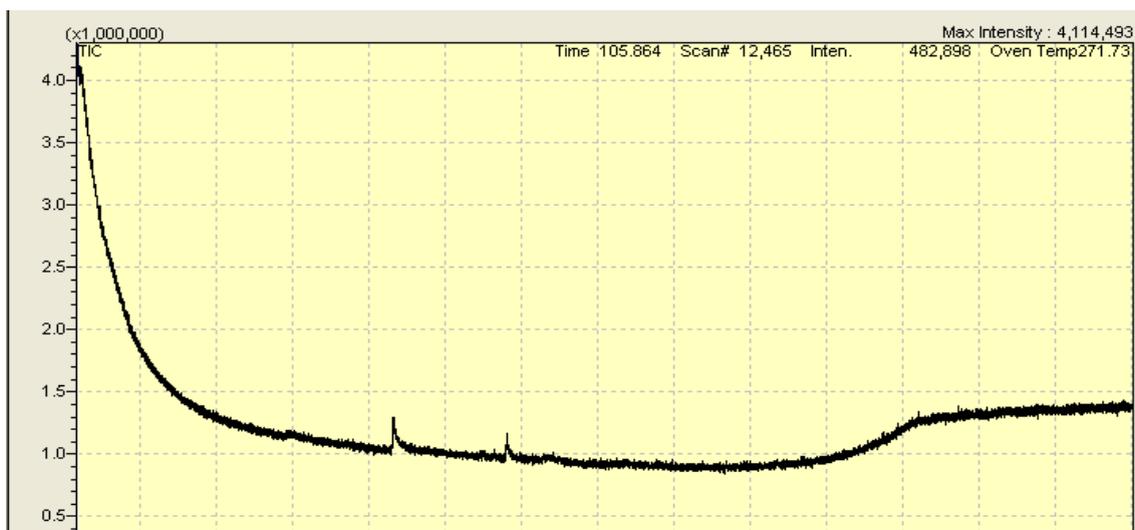
Tempo (min)	Composto	Fórmula
2,3	Ácido fórmico	$\text{CH}_2\text{O}_2$
2,5	3-metil butanol	$\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}$
2,8	Hidroxi propanona (Acetol)	$\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2$
63,5	Ácido palmítico	$\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$
71,8	Ácido linoleico	$\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2$
73,0	Ácido oleico	$\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$

b) Folha de *Myrciaria cauliflora*



Tempo (min)	Composto	Fórmula
2,6	3-metil butanol	$\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}$
98,9	Farnesol	$\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}$
101,6	Hexatriacontano	$\text{C}_{36}\text{H}_{74}$
109,2	alfa-Tocoferol	$\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}_2$
115	Nonadecano	$\text{C}_{29}\text{H}_{60}$

c) Folha de *Spondias dulcis*



Pouco detectável nenhum pico com altura duas vezes maior que o ruído.

d) Folha de *Eucalypto camaldulensis*



Tempo (min)	Composto	Fórmula
2,5	Ácido acético	$C_2H_4O_3$
2,7	Acetol	$C_3H_6O_2$
9,75	1,8-Cineol	$C_{10}H_{18}O$
17,2	Citronella	$C_{10}H_{18}O$
33,3	trans-Cariofileno	$C_{15}H_{24}$

e) Folha de *Corymbia citriodora*



Tempo (min)	Composto	Fórmula
15,4	1,2,2-Trimetil-ciclopropilamina	$C_{16}H_{13}N$
15,9	Citronella	$C_{10}H_{18}O$
20,5	beta-Citronelol	$C_{10}H_{20}O$
27,1	2,6-Dimetil-3,7-octadieno-2-ol	$C_{10}H_{18}O$
40,4	Elemol	$C_{15}H_{26}O$
70,1	Fitol	$C_{20}H_{40}O$

Figura 2: Cromatograma e tabela de composição dos extratos alcoólicos de diferentes extratos vegetais (a) folha de *Xanthosoma violaceum*; b) folha de *Myrciaria cauliflora*; c) folha de *Spondias dulcis*; d) folha de *Eucaliptus camaldulensis*; e) folha de *Corymbia citriodora*.

a) Folha de *Melaleuca quinquinervia*



Tempo (min)	Composto	Fórmula
6,1	alfa-Pineno	$C_{10}H_{16}$
9,6	1,8-Cineol	$C_{10}H_{18}O$
32,3	trans-Cariofileno	$C_{15}H_{24}$
42,9	Veridiflorol	$C_{15}H_{26}O$

b) Folha de *Caryophyllus aromaticus*



Tempo (min)	Composto	Fórmula
30	3-Alil-guaiacol	$C_{10}H_{12}O_2$
32,8	trans-Cariofileno	$C_{15}H_{24}$
34,7	alfa-Humuleno	$C_{15}H_{24}$
39,5	Aceteugenol	$C_{12}H_{14}O_3$
107,5	Hexatriacontano	$C_{36}H_{74}$

c) Folha de *Eucalipto camaldulensis*



Tempo (min)	Composto	Fórmula
9,75	1,8-Cineol	$C_{10}H_{18}O$
16,5	Citronella	$C_{10}H_{18}O$
33,3	trans-Cariofileno	$C_{15}H_{24}$
34,8	beta-Bisaboleno	$C_{15}H_{24}$
37,1	alfa-Humuleno	$C_{15}H_{24}$
42,5	d-Nerolidol	$C_{15}H_{26}O$

Figura 3: Cromatograma e tabela de composição dos extratos hexânicos de diferentes extratos vegetais (a) folha de *Melaleuca quinquinervia*; b) folha de *Caryophyllus aromaticus*; c) folha de *Eucalipto camaldulensis*.

a) Folha de *Eucalyptus camaldulensis*



Tempo (min)	Composto	Fórmula
9,58	1,8-Cineol	$C_{10}H_{18}O$
15,5	Citronella	$C_{10}H_{18}O$
15,9	3-Butin-1-ol	$C_4H_6O$
16,2	Nerol	$C_{10}H_{18}O$
27,5	2-Ciclohepteno-1-ona	$C_7H_{10}O$

b) Folha de *Caryophyllus aromaticus*



Tempo (min)	Composto	Fórmula
10,3	dl-Limoneno	$C_{10}H_{16}$
10,9	trans-Ocimeno	$C_{10}H_{16}$
11,4	gama-Terpineno	$C_{10}H_{16}$
12,7	alfa-Terpineno	$C_{10}H_{16}$
13,7	Linalol	$C_{10}H_{18}O$
23,6	Cavicol	$C_9H_{10}O$
31,7	Eugenol	$C_{10}H_{12}O_2$

c) Folha de *Melaleuca alternifolia*



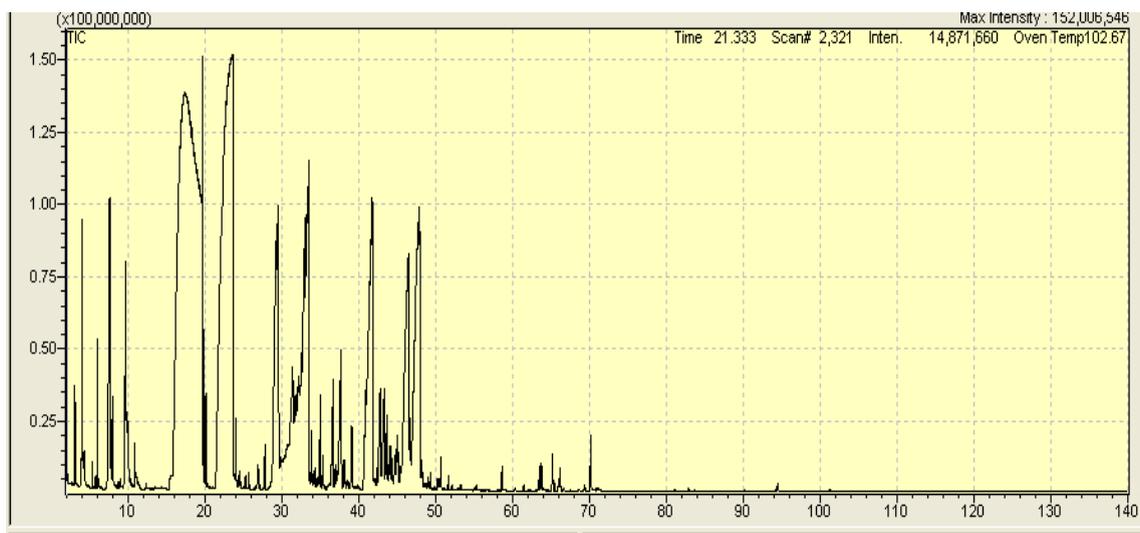
Tempo (min)	Composto	Fórmula
6,1	alfa-Pineno	$C_{10}H_{16}$
9,2	alfa-Terpineno	$C_{10}H_{16}$
10,1	gama-Terpineno	$C_{10}H_{16}$
17,4	4-Terpineol	$C_{10}H_{18}O$

d) Folha de *Melaleuca quinquinervia*



Tempo (min)	Composto	Fórmula
6,1	alfa-Pineno	$C_{10}H_{16}$
7,5	beta-Pineno	$C_{10}H_{16}$
9,3	Limoneno	$C_{10}H_{16}$
9,6	1,8-Cineol	$C_{10}H_{18}O$
18,2	3-Ciclohexeno-1-metanol, 4-trimetil	$C_{10}H_{18}O$
32,3	trans-Cariofileno	$C_{15}H_{24}$
42,9	Veridiflorol	$C_{15}H_{26}O$

e) Folha de *Corymbia citriodora*



Tempo (min)	Composto	Fórmula
3,1	Hexanal	$C_6H_{12}O$
4,12	2-Hexenal, (E)-	$C_6H_{10}O$
6,1	alfa-Pineno	$C_{10}H_{16}$
7,6	beta-Pineno	$C_{10}H_{16}$
9,3	1,8-Cineol	$C_{10}H_{18}O$
17,5	Citronella	$C_{10}H_{18}O$
23,3	beta-Citronella	$C_{10}H_{20}O$
29,9	Acetato de citronelil	$C_{12}H_{22}O$
33,3	trans-Cariofileno	$C_{15}H_{24}$
41,5	Hediacariol	$C_{15}H_{26}O$
45,2	Guaiol	$C_{15}H_{26}O$
47,9	Elemol	$C_{15}H_{26}O$

Figura 4: Cromatograma e tabela de composição dos óleos essenciais de diferentes extratos vegetais (a) folha de *Eucalyptus camaldulensis*; b) folha de *Caryophyllus aromaticus*; c) folha de *Melaleuca alternifolia*; d) folha de *Melaleuca quinquinervia*; e) folha de *Corymbia citriodora*.

## 6. CONCLUSÕES

- Os extratos vegetais avaliados apresentaram diferentes atividades antimicrobianas, embora não tenham apresentado um padrão específico de atividade frente a microorganismos gram-positivos e gram-negativos.
- O extrato aquoso de folha de cajá manga (*Spondias dulcis*), o extrato alcoólico de folha de jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) e de folha de cajá manga (*Spondias dulcis*) e o extrato hexânico de folha de cravo-da-Índia (*Caryophyllus aromaticus*) e melaleuca (*Melaleuca quinquinervia*) se mostraram promissores como agentes antimicrobianos, pois foram capazes de inibir tanto as bactérias gram-negativas quanto as gram-positivas avaliadas.
- A avaliação da composição química dos extratos e óleos essenciais estudados permitiu observar uma variada composição entre eles, permitindo ainda encontrar componentes geralmente reconhecidos como seguros – GRAS.
- O conhecimento da constituição fitoquímica dos extratos e óleos essenciais das plantas é importante, pois constitui uma ferramenta a ser utilizada no controle de qualidade permitindo avaliar e estudar atividades biológicas e/ou farmacológicas que um determinado extrato ou óleo essencial possam apresentar.
- Deve-se considerar a possibilidade de utilizar plantas cultivadas, uma vez que isto permite a produção de material cultivado sob as mesmas condições tornando mais garantida a homogeneidade química, qualitativa e quantitativa dos extratos e óleos essenciais a serem produzidos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADONIZIO, A.L.; DOWNUM, K.; BENNETT, B.C.; MATHEE, K. Anti-quorum sensing activity of medicinal plants in southern Florida. **J. Ethnopharmacol.**, 105: 427-435, 2006.
- ATTERBURY, R.J.; CONNERTON, P.L.; DODD, C.E.R.; REES, C.E.D.; CONNERTON, I.F. Isolation and characterization of *Campylobacter* bacteriophages from retail poultry. **Appl. Environ. Microbiol.**, 69: 4511-18, 2003.
- ATTERBURY, R.J.; DILLON, E.; SWIFT, C.; CONNERTON, P.L.; FROST, J.A.; DODD, C.E.R.; REES, C.E.D.; CONNERTON, I.F. Correlation of *Campylobacter* bacteriophage with reduced presence of hosts in broiler chicken ceca. **Appl. Environ. Microbiol.**, 71: 4885-87, 2005.
- BAEZA, R.; ROSSLER, C.; MIELNICKI, D.; ZAMORA, M.C.; CHIRIFE, J. Theoretical modelling of *Staphylococcus aureus* growth in a cooked meat product kept at ambient temperature using temperature profiles of selected Mexican cities. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 29(1): 81-84, 2009.
- BANES-MARSHALL, L.; CAWLEY, P.; PHILLIPS, C.A. *In vitro* activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against bacterial and *Candida* spp. Isolates from clinical specimens. **Br. J. Biomed. Sci.**, 58:139–145, 2001.
- BARATTA, M.T.; DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G.; FIGUEIREDO, A.C.; BARROSO, J.G.; RUBERTO, G. Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. **Flav. Fragr. J.**, 13: 235-244, 1998.
- BEERY, J.T.; DOYLE, M.P.; SCHOENI, J.L. Colonization of chicken cecae by *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. **Appl. Environ. Microbiol.**, 49: 310-315, 1985.
- BLACK, R.E.; LEVINE, M.M.; CLEMENTS, M.I.; HUGHES, T.P.; BLASER, M.J. Experimental *Campylobacter jejuni* infections in humans. **J. Infect. Dis.**, 157: 472-479, 1988.
- BOPP, C.A.; GREENE, K.D.; DOWNES, F.P.; ET AL. Unusual verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. **J. Clin. Microbiol.**, 25: 1486-89, 1987.
- BORCZYK, A.A.; KARMALI, M.A.; LIOR, H.; DUNCAN, L.M.C. Bovine reservoir for verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. **Lancet.**, 30: p. 98, 1987.
- BUCHANAN, R.L.; DOYLE, M.P. Foodborne Disease Significance of *Escherichia coli* O157:H7 and Other Enterohemorrhagic *E. coli*. **Food Technol.**, 51(10): 69-76, 1997.

- BURT, S.A. Antibacterial activity of essential oils: potential applications in food. Ph.D. thesis, 2007.
- CAPITA, R.; ALVAREZ-ASTORGA, M.; ALONSO-CALLEJA, C.; MORENO, B.; GARCIA-FERNANDEZ, M.C. Occurrence of *Salmonella* in retail chicken carcasses and their products in Spain. **Int. Jour. of Food Microbiol.**, 81: 169-173, 2003.
- CARSON, C.F.; HAMMER, K.A.; RILEY, T.V. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. **Clin. Microbiol. Rev.**, 19(1): 50-62, 2006.
- CELIKEL, N., KAVAS, G. Antimicrobial properties of some essential oils against some pathogenic microorganisms. **Czech J. Food Sci.**, 26: 174–181, 2008.
- CONNER, D. E. Naturally occurring compounds. In P. M. Davidson, & A. L. Branen (Eds.), *Antimicrobials in foods* New York: Marcel Dekker, pp. 441–468, 1993.
- CONNERTON, P.L.; CARRILLO, C.M.L.; DILLON, E.; SCOTT, A.; REES, C.E.D.; DODD, C.E.R.; FROST, J.; CONNERTON, I.F. Longitudinal study of *Campylobacter jejuni* bacteriophages and their hosts from broiler chickens. **Appl. Environ. Microbiol.**, 70: 3877-83, 2004.
- CONTER, M.; PALUDI, D.; ZANARDI, E.; GHIDINI, S.; VERGARA, A.; IANIERI, A. Characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes*. **Int. J. Food Microbiol.**, 128: 497–500, 2009.
- DEANS, S. G.; RITCHIE, G. Antibacterial properties of plant essential oils. **Int. J. Food Microbiol.** 5: 165-180, 1987.
- DELAQUIS, P.J.; STANICH, K.; GIRARD, B.; MAZZA, G. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. **Int. J. Food Microbiol.**, 74: 101-109, 2002.
- DICKENS, J.A.; BERRANG, M.E.; COX, N.A. Efficacy of an Herbal Extract on the Microbiological Quality of Broiler Carcasses During a Simulated Chill. **Poultry Sci.**, 79: 1200-03, 2000.
- DINGLE, K.E.; COLLES, F.M.; FALUSH, D.; MAIDEN, M.C.J. Sequence typing and comparison of population biology of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni*. **J. Clin. Microbiol.**, 43: 340-347, 2005.
- DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **J. Appl. Microbiol.**, 88: 308–316, 2000.
- DOYLE, M.P.; SCHOENI, J.L. Isolation of *Escherichia coli* 0157:H7 from Retail Fresh Meats and Poultry. **Appl. Environ. Microbiol.**, 53(10): 2394-96, 1987.
- DOYLE, M.P.; SCHOENI, J.L. Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. **Appl. Environ. Microbiol.**, 48: 855-56, 1984.
- ELSOM, G.K.F.; HIDE, D. Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to tea tree oil and mupirocin. **J. Antimicrob. Chemother.**, 43: 427–428, 1999.
- ESTANISLAU, A.A.; BARROS, F.A.S.; PEÑA, A.P.; SANTOS, S.C.; FERRI, P.H.; PAULA, J.R. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de cinco espécies de *Eucalyptus* cultivadas em Goiás. **Rev. Bras. Farmacognos.**, 11(2): 95-100, 2001.

FDA (U.S. Food and Drug Administration). GRAS Notice Inventory. Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/fcnNavigation.cfm?rpt=grasListing&page=1>>. Acesso em: 13 fev. 2010.

FENG, P. *Escherichia coli* Serotype O157:H7: Novel Vehicles of Infection and Emergence of Phenotypic Variants. **EID.**, 1(2): 47-52, 1995.

FIGUEROA, G.G.; NAVARRETE, P.; CARO, M.; TRONCOSO, M.; FAÚNDEZ, G. Portación de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénicos en manipuladores de alimentos. **Revista médica de Chile**, 130(8): 859 - 864, 2002.

FLAHAUT, S.; BOUTIBONNES, P.; AUFRAY, Y. Les Enterocoques dans l'environnement proche de l'homme. **Can. J. Microbiol.**, 43: 699-708, 1997.

FRANCO, B. D. G. H.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos**. Ed. Atheneu. São Paulo, 46-50. 182 p., 1996.

FRANCO, J.; NAKASHIMA, T.; FRANCO, L.; BOLLER, C. Composição química e atividade antimicrobiana in vitro do óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* F. Mull. ex Benth., Myrtaceae, extraído em diferentes intervalos de tempo. **Rev. bras. farmacogn.**, 15(3):191-194, 2005.

FRANZ, C.M.A.P.; HOLZAPFEL, W.H.; STILES, M.E. Enterococci at the crossroads of food safety? **Int. J. Food Microbiol.**, 47: 1-24, 1999.

FRANZ, C.M.A.P.; STILES, M.E.; SCHLEIFER, K.H.; HOLZAPFEL, W.H. Enterococci in foods - a conundrum for food safety. **Int. J. Food Microbiol.**, 88: 105-122, 2003.

FROST, J.A.; KRAMER, J.M.; GILLANDERS, S.A. Phage typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* and its use as an adjunct to serotyping. **Epidemiol. Infect.**, 123: 47-55, 1999.

GAUTHIER, R.D.V.M. Organic acids and essential oils, a realistic alternative to antibiotic growth promoters in poultry. In: FÓRUM INTERNACIONAL DE AVICULTURA, 1, 2005. Foz do Iguaçu. Anais ....., Foz do Iguaçu, 2005. p. 148-157. Disponível em: <<http://www.jefo.ca/pdf/avicola/AnaisAveExpo-R.Gauthier.pdf>>. Acesso em: 13 mai. 2008.

GILLESPIE, I. A.; O'BRIEN, S. J.; FROST, J. A.; ADAK, G. K.; HORBY, P.; SWAN, A. V.; PAINTER, M. J.; NEAL, K. R. A case-case comparison of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* infection: a tool for generating hypotheses. **Emerg. Infect. Dis.**, 8: 937-942, 2002.

GLASS, K.A.; DOYLE, M.P. Fate and thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in beaker sausage and pepperoni. **J. Food Prot.**, 52: 226-231, 1989.

GRIFFIN PM. *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In *Infections of the Gastrointestinal Tract*, ed. MJ Blaser, PD Smith, JI Ravdin, HB Greenberg, RL Guerrant, 1: 739-761. New York: Raven, 1995.

GRIFFIN, P.M.; TAUXE, R.V. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. **Epidemiol Rev.**, 13: 60-98, 1991.

GUNDOGAN, N.; CITAK, S.; YUCEL, N.; DEVREN, A. A note on the incidence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from meat and chicken samples. **Meat Sci.**, 69: 807-810, 2005.

- GÜRTLER, M.; ALTER, T.; KASIMIR, S.; FEHLHABER, K. The importance of *Campylobacter coli* in human campylobacteriosis: prevalence and genetic characterization. **Epidemiol. Infect.**, 133: 1081-87, 2005.
- HADA, T.; FURUSE, S.; MATSUMOTO, Y.; HAMASHIMA, H.; MASUDA, K.; SHIOJIMA, K.; ARAI, T.; SASATSU, M. Comparison of the effects in vitro of tea tree oil and plaunotol on methicillin-susceptible and methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. **Microbios.** 106(2): 133-141, 2001.
- HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **J. Appl. Microbiol.**, 86: 985-990, 1999.
- HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Susceptibility of transient and commensal skin flora to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Am. J. Infect. Control.**, 24: 186-189, 1996.
- HAYES, P.S.; BLOM, K.; FENG, P.; LEWIS, J.; STROCKBINE, N.A.; SWAMINATHAN, B. Isolation and characterization of a D-glucuronidase-producing strain of *Escherichia coli* serotype O157:H7 in the United States. **J. Clin. Microbiol.**, 33: 3347-48, 1995.
- HOOD, J.R.; WILKINSON, J.M.; CAVANAGH, H.M.A. Evaluation of common antibacterial screening methods utilized in essential oil research. **J. Essent. Oil Res.**, 15: 428-433, 2003.
- HOPKINS, K.L.; DESAI, M.D.; FROST, J.A.; STANLEY, J.; LOGAN, J.M.J. Fluorescent amplified fragment length polymorphism genotyping of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains and its relationship with host specificity, serotyping and phage typing. **J. Clin. Microbiol.**, 42: 229-235, 2004.
- HUANG, S.; WEI, H.; LEE, Y. One-step immunochromatographic assay for the detection of *Staphylococcus aureus*. **Food Control.**, 18: 893-897, 2007.
- HUHTANEN, C.N. Inhibition of *Clostridium botulinum* by spice extracts and aliphatic alcohols. **J. Food Prot.**, 43: 195-196, 1980.
- HUDSON, J.A. Encyclopedia of Meat Sciences. In: HUDSON, J. A. (Ed). 2004
- JAY, J.M. **Microbiologia dos alimentos**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, p. 471-490, 2005.
- JETT, B.D.; HUYCKE, M.M.; GILMORE, M.S. Virulence of enterococci. **Clin. Microbiol. Rev.**, 7: 462-478, 1994.
- JORGENSE, J.H., TURNIOGE, J.D., WASHINGTON, J.A. Antibacterial Susceptibility Tests: Dilution and Disc Diffusion Methods. in: MURRAY, P.R., BARON, E.J., PFALLER, M.A., TENDUER, F.C., YOLKEN, R.H. **Manual of Clinical Microbiology**. cap. 118. Section VIII. p. 1526-1543. 7th edition. ASM Press, 1999.
- JÚNIOR, D.S.; QUEIROZ, A.C.; LANA, R.P.; PACHECO, C.G.; EIFERT, E.C.; NUNES, P.M. Ação da própolis sobre a desaminação de aminoácidos e a fermentação ruminal. **Rev. Bras. Zootec.**, 33: 1086-92, 2004.
- KARMALI, M.A. Infection by Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev.**, 2: 15-38, 1989.
- KERLEY, J.M. Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. **Microbiology.**, 143: 5-21, 1997.

KIM, H.H.; SAMADPOUR, M.; GRIMM, L.; CLAUSEN, C.R.; BESSER, T.E.; BAYLOR, M.; KOBAYASHI, J.M.; NEILL, M.A.; SCHOENKNECHT, F.D.; TARR, P.I. Characteristics of antibiotic-resistant *Escherichia coli* O157:H7 in Washington state. **J. Infect. Dis.**, 170: 1606-09, 1994.

KIM, J.; MARSHALL, M.R.; WEI, C. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. **J. Agric. Food Chem.**, 43: 2839-45, 1995.

KNUDTSON, L.M., HARTMAN, P.A. Enterococci in pork processing. **J. Food Protec.**, 56: 6-9, 1993.

KOTTWITZ, L.B.M. **Salmonella spp.: Avaliação epidemiológica de surtos notificados no Paraná e caracterização de isolados epidêmicos e de origem avícola.** Londrina – PR 2009. 127p. Dissertação [Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos] – Universidade Estadual de Londrina, PR. 2009.

KOTZEKIDOU, P.; GIANNAKIDIS, P.; BOULAMATSIS, A. Antimicrobial activity of some plant extracts and essential oils against foodborne pathogens in vitro and on the fate of inoculated pathogens in chocolate. **LWT.**, 41: 119-127, 2008.

KOYAMA, S.; YAMAGUCHI, Y.; TANAKA, S.; MOTOYASHIMA, J. A new substance (yoshixol) with an interesting antibiotic mechanism from wood oil of Japanese traditional tree (kiso hinoki), *Chamaecyparis obtusa*. **General Pharmacol.**, 28: 797-804, 1997.

KWANG, J.; LITLEDIKE, E.T.; KEEN, J.E. Use of the polymerase chain reaction for *Salmonella* detection. **Lett. of Appl. Microbiol.**, 22: 46-51, 1996.

LANDGRAF, M. Novos patógenos de interesse em alimentos. **Bol. SBCTA** 31 (1): 5-7, 1997.

LECLERCQ, R. Enterococci acquire new kinds of resistance. **Clin. Infect. Dis.**, 24 (Suppl. 1): S80- S84, 1997.

LEON-VELARDE, C.G.; CAI, H.I.; LARKIN, C.; BELL-ROGERS, P.; STEVENS, R.W.C.; ODUMERU, J.A. Evaluation of methods for the identification of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 from poultry environmental samples. **J. Microbiol. Methods**. 58: 79-86. 2004.

LIMA, J.L. A proliferação da *Salmonella* no Brasil. **O povo online**. Disponível em: <[www.opovo.com.br](http://www.opovo.com.br)>. Acesso em: 5 de julho de 2008.

LINDQVIST, R.; SYLVÉN, S.; VAGSHOLM, I. Quantitative microbial risk assessment exemplified by *Staphylococcus aureus* in unripened cheese made from rAw milk. **Intern. J. Food Microbiol.**, 78: 155- 170, 2002.

MACEDO-COSTA, M.R.; DINIZ, D.N.; CARVALHO, C.M.; PEREIRA, M.S.V.; PEREIRA, J.V.; HIGINO, J.S. Eficácia do extrato de *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg. (jabuticabeira) sobre bactérias orais. **Rev. Bras. Farmacogn.**, 19(2b): 565-571, 2009.

MAGNUS, C.A.; MCCURDY, A.R.; INGLEDEW, W.M. Further studies on the thermal resistance of *Streptococcus faecium* and *Streptococcus faecalis* in pasteurized ham. **Can. Inst. Food Sci. Technol. J.**, 21: 209-212, 1988.

MAY, J.; CHAN, C.H.; KING, A.; WILLIAMS, L.; FRENCH, G.L. Time-kill studies of tea tree oils on clinical isolates. **J. Antimicrob. Chemother.** 45: 639-643, 2000.

- MELÉNDEZ, P.A.; CAPRILES, V.A. Antibacterial properties of tropical plants from Puerto Rico. **Phytomed.** 13(4): 272-276, 2006.
- 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. **Braz. J. Pharmacogn.**, 15(4): 316-320, 2005.
- MIMS, C.A.; PLAYFAIR, J.H.L.; ROITT, I. M.; WILLIAMS, R. **Microbiologia Médica.** 1ª ed. Manole. São Paulo, 1995.
- MORENO, M.R.F.; SARANTINOPOULOS, P.; TSAKALIDOU, E.; VUYST, L. The role and application of enterococci in food and health. **Int. J. Food Microbiol.**, 106: 1-24, 2006.
- MORRISON, D.; WOODFORD, N.; COOKSON, B. Enterococci as emerging pathogens of humans. **J. Appl. Microbiol. Symp. Suppl.**, 83: 89S– 99S, 1997.
- MORTON, H.E. **Alcohols.** In: S.S. Block, Editor, Disinfection, Sterilization and Preservation, Lea and Febiger, Philadelphia, pp. 225–239, 1983.
- MURRAY, B.E. The life and times of the *Enterococcus*. **Clin. Microbiol. Ver.**, 3: 46–65, 1990.
- NAKATANI, N. Antioxidative and antimicrobial constituents of herbs and spices. **Dev. Food Sci.**, 34: 251–271, 1994.
- NASCIMENTO, G.G.F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P.C.; SILVA, G.L. Antibacterial Activity of Plant Extracts and Phytochemicals on Antibiotic Resistant Bacteria. **Braz. J. Microbiol.** 31: 247-256, 2000.
- NASCIMENTO, P.F.C.; NASCIMENTO, A.C.; RODRIGUES, C.S.; ANTONIOLLI, A.R.; SANTOS, P.O.; BARBOSA JÚNIOR, A.M.; TRINDADE, R.C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Braz. J. Pharmacogn.** 17(1): 108-113, 2007.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically.** Approved standard M7-A4. Wayne, Pa: National Committee for Clinical Laboratory Standard, 1997. 32p
- NEMA, V.; AGRAWAL, R.; KAMBOJ, D.V.; GOEL, A.K.; SINGH, L. Isolation and characterization of heat resistant enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* from a food poisoning outbreak in Indian subcontinent. **Int. J. Food Microbiol.**, 117: 29–35, 2007.
- NEWELL, D.G. Animal models of *Campylobacter jejuni* colonization and disease and the lessons to be learned from similar *Helicobacter pylori* models. **Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol.**, 30: 57S–67S, 2001.
- NEWELL, D.G.; FEAMLEY, C. Sources of *Campylobacter* colonization in broiler chickens. **Appl. Environ. Microbiol.**, 69: 4343-51, 2003.
- NEWSOME, R.L.; STEWART, C.M. Bacteria Associated with Foodborne Diseases. **Institute of Food Technologists.** 2004.
- NICHOLS, G. I. Fly transmission of *Campylobacter*. *Emerg. Infect. Dis.* [serial on the internet], v. 11, p. 1-7, 2005. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol11no03/04-0460.htm>>. Acesso em: 29 jul. 2009.

NIKAIDO, H. Outer membrane. In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*; Neidhardt, F. C., Ed.; ASM Press., 1: 29-471, 1996.

OLIVEIRA, K.A.M. Prevalência de *Campylobacter* spp. e de *Enterococcus* spp. no ambiente de criação de frangos de corte. Viçosa: Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFV. 2006. 147 p. (Tese, Doutorado em Ciência de Alimentos).

PAI, C.H.; GORDON, R.; SWISS, H.V.; BRYAN, L.E. Sporadic cases of hemorrhagic colitis, associated with *Escherichia coli* O157:H7. **Ann. Intern. Med.**, 101: 738–742, 1984.

PEARSON, L.J.; MARTH, E.H. *Listeria monocytogenes*-Threat to a Safe Food Supply: A Review. **J Dairy Sci.**, 73: 912-928, 1990

PELCZAR, M.L.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. Control of microorganisms, the control of microorganisms by physical agents. In: **Microbiology**, New York: Mc GrAw-Hill International. pp. 469-509, 1988.

PENHA, G.A.; SUZUKI, E.U.; EUDA, F.S.; PEREIRA, R.E.P. Diagnóstico da Salmonelose e sua importância para a avicultura: Revisão de Literatura. **Rev. Cient. Eletrôn. de Med. Vet.**, VI(10), 2008.

PEREIRA, M.L.; ROCOURT, J. *Listeria monocytogenes*: Uma revisão sobre aspectos taxonômicos, importância médica e em alimentos. **Rev. Higien. Alim.**, 7 (26): 5-12, 1993.

RATNAM, S.; MARCH, S.B.; AHMED, R.; BEZANSON, G.S.; KASATIYA, S. Characterization of *Escherichia coli* serotype O157:H7. *J. Clin. Microbiol.*, 26: 2006-12, 1988.

REYNERTSON, K.A.; WALLACE, A.M.; ADACHI, S.; GIL, R.R.; YANG, H.; BASILE, M.J.; D'ARMIENTO, J.; WEINSTEIN, I.B.; KENNELLY, E.J.. Bioactive depsides and anthocyanins from Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*). **J Nat Prod.**, 69: 1228-30, 2006.

RILEY, L.W.; REMIS, R.S.; HELGERSON, S.D.; MCGEE, H.B.; WELLS, J.G.; DAVIS, B.R.; HEBERT, R.J.; OLCOTT, E.S.; JOHNSON, L.M.; HARGRETT, N.T.; BLAKE, P.A.; COHEN, M.L. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **N. Engl. J. Med.**, 308: 681-685, 1983.

ROBINSON, D.A. Infective dose of *Campylobacter jejuni* in milk. **Br. Med. J.**, 282: 1584, 1981.

RODE, T.M.; LANGSRUD, S.; HOLCK, A.; MORETRO, T. Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. **Int. J. Food Microbiol.**, 116: 372-383, 2007.

SALAZAR, E.B.; BENAVIDES, J.; SEPULVEDA, L.; QUIÑONES, W.; TORRES, F.; CARDONA, D.; ARCHBOLD, R.; GUZMAN, J.D.; SUÁREZ, E.C.; FRANZBLAU, S. Actividad Antimicrobacteriana de Algunas Plantas de la Flora Colombiana. **Sci. Techn.**, XIII(33): 133-136, 2007.

SALEHA, A.; IBRAHIM, A.; KAMARZAMAN, A. *Campylobacter* in village chickens: prevalence and biotypes. **J. Vet. Malaysia.**, 8: 25–27, 1996.

SCHABERG, D.R.; CULVER, D.H.; GAYNES, R.P. Major trends in microbial etiology of nosocomial infection. **Am. J. Med. Suppl.**, 3B: 725–758, 1991.

SCHERER, K.; BARTELT, E.; SOMMERFELD, C.; HILDEBRANDT, G. Comparison of different sampling techniques and enumeration methods for the isolation and quantification of *Campylobacter* spp. In rAw retail chicken legs. **Int. J. Food Microbiol.**, 108: 115-119, 2006.

SCHEUERMANN, G.N.; JÚNIOR, A.C. Perspectivas para a utilização de produtos de origem vegetal como aditivos alternativos na alimentação de aves. In: FÓRUM INTERNACIONAL DE AVICULTURA, AVE EXPO, 2005. Disponível em: <[http://www.engormix.com/perspectivas\\_a\\_utilizacao\\_produtos\\_p\\_artigos\\_16\\_AVG.htm](http://www.engormix.com/perspectivas_a_utilizacao_produtos_p_artigos_16_AVG.htm)>. Acesso em: 13 mai 2008.

SCHLECH III, W.F. Foodborne Listeriosis. **Clin Infec Diseas.**, 31: 770–775, 2000.

SHALE, K.; LUES, J.F.R.; VENTER, P.; BUYS, E.M.; The distribution of *Staphylococcus* sp. on bovine meat from abattoir deboning rooms. **Food Microbiol.**, 22: 433–438, 2005.

SHALE, T.L.; STIRK, W.A.; VAN STADEN, J. Screening of medicinal plants used in Lesotho for anti-bacterial and anti-inflammatory activity, **J. of Ethnopharmacol.**, 67: 347-354, 1999.

SIKKEMA, J.; DE BONT, J.A.M.; POOLMAN, B. Mechanism of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiol. Rev.**, 59: 201–222, 1995.

SILVA, N. da; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R. F.S. dos; GOMES, R.A.R. **Manu. de Mét. de Análise Microbiol. de Alimentos**. 3ª ed. 2007.

SILVEIRA, C.S.; PESSANHA, C.M.; LOURENÇO, M.C.S.; NEVES JUNIOR, I.; MENEZES, F.S.; KAPLAN, M.A.C. Atividade antimicrobiana dos frutos de *Syagrus oleracea* e *Mauritia vinifera*. **Braz. J. Pharmacog.**, 15(2): 143-148, 2005.

SILVEIRA, F. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. Curitiba, 26p. Monografia (Especialização em Ciências Farmacêuticas - Produtos Naturais), Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 1997.

SIMONI, I.C. Tratamentos antivirais. In: Palestra. Biológico, v. 65, p. 41-44, 2003.

SKANDAMIS, P.N.; NYCHAS, G.J. Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. **J. Appl. Microbiol.**, 91(6): 1011-22, 2001.

SLUTSKER, L.; RIES, A.A.; GREENE, K.D.; WELLS, J.G.; HUTWAGNER, L.; GRIFFIN, P.M. *Escherichia coli* O157:H7 diarrhea in the United States: clinical and epidemiologic features. **Ann. Intern. Med.**, 126: 505-13, 1997.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Lett. Appl. Microbiol.**, 26: 118–122, 1998.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Influence of subinhibitory concentrations of plant essential oils on the production of enterotoxins A and B and a-toxin by *Staphylococcus aureus*. **J. Med. Microbiol.**, 53: 1023-27, 2004.

SOUZA, T.M. Estudo farmacognóstico e avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de preparações cosméticas contendo o extrato de folhas de *Myrciaria cauliflora* O. Berg. (Myrtaceae) e de casca de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae-Mimosoidae. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Dissertação, Mestrado em Ciências Farmacêuticas, p.171., 2007

- STERN, N.J.; XOX, N.A.; BAILEY, M.E.; BERRANG, M.E.; MUSGROVE, M.T. Comparison of mucosal competitive exclusion and competitive exclusion treatment to reduce *Salmonella* and *Campylobacter* spp. colonization in broiler chickens. **Poultry Sci.**, 80: 156-160, 2001.
- SU, L.H.; CHIU, C.H. Salmonella: Clinical importance and evolution of nomenclature. **Chang Gung Medical J.**, 30(3): 210-219, 2007.
- TAREMI, M.; DALLAL, M.M.S.; GACHKAR, L.; MOEZARDALAN, S.; ZOLFAGHARIAN, K.; ZALI, M.R. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolated from retail rAw chicken and beef meat, Tehran, Iran. **Int. J. Food Microbiol.**, 108: 401-403, 2006.
- TURTURA, G.C., LORENZELLI, P. Gram-positive cocci isolated from slaughtered poultry. **Microbiol. Res.**, 149: 203-213, 1994.
- USHIMARU, P.I.; SILVA, M.T.N.; STASI, L.C.; BARBOSA, L.; FERNANDES JUNIOR, A. Antibacterial Activity of Medicinal Plant Extracts. **Braz. J. Microbiol.**, 38: 717-719, 2007.
- VAN GERWE, T.J.W.M.; BOUMA, A.; JACOBS-REITSMA, W.F.; VAN DEN BROEK, J.; KLINKENBERG, D.; STEGEMAN, J.A.; HEESTERBEEK, J.A.P. Quantifying transmission of *Campylobacter* spp. among broilers. **Appl. Environ. Microbiol.**, 71: 5765-70, 2005.
- VANDAMME, P.; DEWHIRST, F.E.; PASTER, B.J.; ON, S.L.W. Genus I. *Campylobacter*. In: BRENNER, D.J. et al (Eds), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2<sup>nd</sup> Ed.**, Vol. 2, Part C. Springer, New York, 2005.
- VUDDHAKUL, V.; BHOOPONGA, P.; HAYEEBILANA, F.; SUBHADHIRASAKULB, S. Inhibitory activity of Thai condiments on pandemic strain of *Vibrio parahaemolyticus*. **Food Microbiol.**, 24: 413-418, 2007.
- WAGEMAAAR, J.A.; VAN BERGEN, A.P.; MUELLER, M.A.; WASSENAAR, T.M.; CARLTON, R.M. Phage therapy reduces *Campylobacter jejuni* colonization in broilers. **Vet. Microbiol.**, 109: 275-283, 2005.
- WARREN, D.K.; LIAO, R.S.; MERZ, L.R.; EVELAND, M.; DUNNE JÚNIOR, W.M. Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Directly from Nasal Swab Specimens by a Real-Time PCR Assay. **J.Clin. Microbiol.**, 42(12): 5578-81, 2004.
- WASSENAAR, T.M. Toxin production by *Campylobacter* spp. **Clin. Microbiol. Rev.**, 10: 466-476, 1997.
- WASSENAAR, T.M.; GEILHAUSEN, B.; NEWELL, D.G. Evidence of genomic instability in *Campylobacter jejuni* isolated from poultry. **Appl. Environ. Microbiol.**, 64: 1816-21, 1998.
- WELLS, J.G.; DAVIS, B.R.; WACHSMUTH, I.K.; RILEY, L.W.; REMIS, R.S.; SOKOLOW, R.S.R.; MORRIS, G.K. Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **J. Clin. Microbiol.**, 18: 512-520, 1983.
- WHO (World Health Organization). Antimicrobial resistance in shigellosis, cholera and Campylobacteriosis. A background document for the WHO global strategy for containment of antimicrobial resistance. WHO, 2001. Disponível em:  
<<http://www.who.int/csr/resources/publications/drugresist/shigellosis.pdf>> Acesso em 13 mai. 2008.

WHO (World Health Organization). Use of antimicrobials outside human medicine and resultant antimicrobial resistance in humans. 2002. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factleaves>>. Acesso em: 13 nov. 2005.

WHO. (World Health Organization). Food Safety and Foodborne illness. 2003. Disponível em: <<http://www.who.int/fin-fs/en/fact237.html>>. Acesso em: 27 set. 2009.

YAN, S.S.; PENDRAK, M.L.; ABELA-RIDDER, B.; PUNDERSON, J.W.; FEDORKO, D. P.; FOLEY, S.L. An overview of Salmonella typing Public health perspectives. **Clin. and Appl. Immunol. Reviews**. 4: 189-204, 2003.

VALENTE, V.M.M. Caracterização de anti-fúngicos em óleo essencial de noz-moscada (*Myristica fragans*). Viçosa: Departamento de Bioquímica da UFV. 2005. 93 p. (Dissertação, Mestrado em Bioquímica).

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)