



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

**EFEITO ANTIMICROBIANO E ANTIADERENTE *IN VITRO*  
DE PLANTAS DA CAATINGA FRENTE A MICRO-ORGANISMOS  
PATOGENICOS DE INTERESSE NA ÁREA DE ALIMENTOS**

FERNANDA MARIA LINO DE MOURA

RECIFE - PE  
2013



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

**EFEITO ANTIMICROBIANO E ANTIADERENTE *IN VITRO* DE  
PLANTAS DA CAATINGA FRENTE A MICRO-ORGANISMOS  
PATOGENICOS DE INTERESSE NA ÁREA DE ALIMENTOS**

FERNANDA MARIA LINO DE MOURA

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal Tropical.

Orientador: Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa - UNIVASF

Co-orientadora: Profa. Dra. Andrea Paiva Botelho Lapenda de Moura - UFRPE

RECIFE - PE  
2013

## Ficha Catalográfica

M929e    Moura, Fernanda Maria Lino de  
          Efeito antimicrobiano e antiaderente *in vitro* de plantas da  
          caatinga frente a micro-organismos patogênicos de interesse na  
          área de alimentos / Fernanda Maria Lino de Moura. -- Recife,  
          2013.

71 f.: il.

Orientador (a): Mateus Matiuzzi da Costa.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal Tropical) –  
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de  
Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2013.

Referências.

1. Antimicrobiano vegetal 2. Biofilme 3. Doenças  
transmitidas por alimentos 4. Patógenos 5. Produtos naturais  
I. Costa, Mateus Matiuzzi da, orientador II. Título

CDD 591.4

Dissertação à disposição na Biblioteca Central da Universidade Federal Rural de Pernambuco.  
A transcrição ou utilização de trechos deste trabalho é permitida, desde que respeitadas as  
normas de ética científica.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

**EFEITO ANTIMICROBIANO E ANTIADERENTE *IN VITRO* DE  
PLANTAS DA CAATINGA FRENTE A MICRO-ORGANISMOS  
PATOGENICOS DE INTERESSE NA ÁREA DE ALIMENTOS**

*Fernanda Maria Lino de Moura*

Fernanda Maria Lino de Moura

APROVADA EM 27/02/2013

BANCA EXAMINADORA

*Mateus MatiuZZi da Costa*  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Mateus MatiuZZi da Costa (UNIVASF)  
Orientador – Presidente

*Andrea Paiva Botelho Lapenda de Moura*  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Andrea Paiva Botelho Lapenda de Moura (UFRPE)  
Co-orientadora

*Andrea Alice Fonseca Oliveira*  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Andrea Alice Fonseca Oliveira (UFRPE)  
Primeiro membro

*José Wilton Pinheiro Júnior*  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. José Wilton Pinheiro Júnior (UFRPE)  
Segundo membro

*“Os erros e os acertos são caminhos  
necessários ao conhecimento”.*

*Lino Macedo*

*À minha mãe Madalena Moura e à minha “irmã” Luciana Moura  
pelo amor de sempre. Por me guiarem em minhas escolhas,  
apoíarem e compreenderem os momentos de ausência.  
Amo vocês, anjos da minha vida!*

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, a Deus, por mais esta conquista, por me dar forças sempre que achei que não seria possível concluir.

Às minhas amigas, companheiras de mestrado Cecília Oliveira e Jacqueline Ellen, por todo o apoio e incentivo durante o período, por todos os momentos vivenciados. Não sei como seria sem a presença de vocês.

A todos do Laboratório de Inspeção de Carne e Saúde Pública (UFRPE). À Goretti Varejão pelo acompanhamento inicial da parte experimental e à Mariana Siqueira pelos momentos de convivência no laboratório.

Ao prof Rinaldo Mota e ao pessoal do Laboratório de Bacterioses (UFRPE), por me cederem materiais e o espaço, sempre que foi necessário. Em especial à Maina Almeida, Pomy Kim, Índio (Carlos Adriano), Pedro Paulo, Orestes Luiz, André Santos, André Mota, Erika Samico, Marcela Samico, Débora Viegas, Renata, Luana Rapôso e Giva (Givanildo Silva) pela ajuda nas horas difíceis, pelos momentos de descontração, pelas gargalhadas que ajudaram a esquecer dos problemas. Vocês foram muito importantes.

A todos do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal (UNIVASF), por me receberem com tanto carinho. Ceiza Aquino, Rafael Libório, Samily Aquino, Rodolfo Peixoto e Carina Krewer obrigada pelo apoio e ajuda imprescindíveis na parte experimental.

Ao prof Jackson Almeida (UNIVASF) pelo preparo dos extratos utilizados.

À dona Erani e Gabriel pela acomodação tão acolhedora em Petrolina - PE, durante a realização do experimento.

À Gisele Veneroni e João Gouveia pelo apoio e pelas caronas diárias em Petrolina.

Aos profs Andrea Alice e José Wilton pelas contribuições enquanto banca examinadora.

À profa Andrea Paiva pelo apoio durante a co-orientação e por me acompanhar desde a graduação. Muito obrigada!

Ao prof Mateus Matiuzzi, pela confiança, compreensão e apoio dedicados durante a orientação. Muito obrigada! Imensa admiração eu adquiri pelo senhor.

Por fim, a todos que eu não citei e que tenham contribuído para que fosse possível a realização deste trabalho.

## **FONTES FINACIADORAS**

**CAPES** – Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior.

**CNPq** – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

## LISTA DE TABELAS

### Artigo

<b>Tabela 1:</b> Susceptibilidade <i>in vitro</i> de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella</i> spp. e <i>Escherichia coli</i> isolados de amostras de leite e queijo provenientes do semiárido pernambucano e baiano frente aos extratos etanólicos de <i>Amburana cearensis</i> A. C. Smith e de <i>Hymenaea martiana</i> Hayne.	52
--	----

### Comunicação Científica

<b>Tabela 1:</b> Efeito <i>in vitro</i> do extrato etanólico de <i>Hymenaea martiana</i> Hayne sobre o biofilme consolidado de <i>Staphylococcus aureus</i> obtidos de amostras de leite do semiárido pernambucano e baiano.	66
--	----

<b>Tabela 2:</b> Efeito <i>in vitro</i> do extrato etanólico de <i>Hymenaea martiana</i> Hayne sobre o biofilme em formação de <i>Staphylococcus aureus</i> obtidos de amostras de leite do semiárido pernambucano e baiano.	67
--	----

## LISTA DE FIGURAS

### Revisão de Literatura

- Figura 1:** Etapas de formação de biofilme microbiano. 21
- Figura 2:** *Amburana cearensis* A. C. Smith. 30
- Figura 3:** *Hymenaea martiana* Hayne. 32

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	13
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	15
<b>2.1 Segurança alimentar</b>	15
<b>2.2 Doenças transmitidas por alimentos</b>	15
2.2.1 <i>Salmonella</i> spp.	18
2.2.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	19
2.2.3 <i>Escherichia coli</i>	19
<b>2.3 Biofilme microbiano</b>	20
2.3.1 Formação de biofilme microbiano	20
2.3.2 Importância dos biofilmes na área de alimentos	23
2.3.3 Biofilme de <i>Staphylococcus aureus</i>	24
<b>2.4 Etnobotânica</b>	24
2.4.1 Compostos bioativos	25
<b>2.4.1.1 Principais metabólitos secundários</b>	26
<b>2.4.1.2 Utilização de material vegetal em alimentos</b>	29
2.4.2 <i>Amburana cearensis</i> A. C. Smith	30
2.4.3 <i>Hymenaea martiana</i> Hayne	32
<b>3 OBJETIVOS</b>	34
<b>3.1 Geral</b>	34
<b>3.2 Específicos</b>	34
<b>REFERÊNCIAS</b>	35
<b>ARTIGO</b>	47
<b>COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA</b>	63
<b>CONCLUSÃO</b>	71

## RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito antimicrobiano do extrato etanólico de *Hymenaea martiana* Hayne e de *Amburana cearensis* A. C. Smith, frente *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* isolados de amostras de leite e queijo provenientes de propriedades rurais do semiárido pernambucano e baiano, além das respectivas cepas ATCC, e avaliar o efeito antiaderente de *Hymenaea martiana* Hayne frente a cepas de *S. aureus*. Na avaliação da atividade antimicrobiana, para a determinação da concentração bactericida mínima, foram utilizadas placas de microtitulação contendo caldo Mueller-Hinton e após incubação do material, com a utilização de um replicador, alíquotas foram semeadas em placas de petri contendo ágar Mueller-Hinton, seguindo-se de nova incubação. Observou-se que *A. cearensis* inibiu 80% das amostras de *S. aureus*, 4,2% das amostras de *Salmonella* spp., mas não apresentou efeito nas amostras de *E. coli*. *H. martiana* inibiu 100% das amostras de *S. aureus*, 33% das de *Salmonella* spp. e também não apresentou efeito nos isolados de *E. coli*. Já em relação à atividade antiaderente, através da obtenção da absorbância realizada em leitor de microplacas a 595nm, observou-se que o biofilme consolidado apresentou 60% de redução com a concentração de 781,2 µg/mL, e que todas as concentrações utilizadas inibiram o biofilme em formação. Concluiu-se que os extratos etanólicos de *H. martiana* Hayne e de *A. cearensis* A. C. Smith apresentaram atividade antimicrobiana sobre isolados de *S. aureus* e *Salmonella* spp., mas não sobre *E. coli*, e que o extrato de *H. martiana* Hayne apresentou atividade antiaderente sobre as cepas de *S. aureus*. Diante disso, sugere-se que os antimicrobianos e antiaderentes naturais podem oferecer vantagens para a área de alimentos, favorecendo a qualidade higiênico-sanitária e a vida útil dos produtos.

**Palavras-chave:** Antimicrobiano vegetal. Biofilme. Doenças transmitidas por alimentos. Patógenos. Produtos naturais.

## ABSTRACT

This study aimed to evaluate the antimicrobial effect of ethanol extract of *Hymenaea martiana* Hayne and *Amburana cearensis* A. C. Smith, against *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. and *Escherichia coli*. isolated from samples of milk and cheese from farms in semiarid Pernambuco and Baiano, beyond their ATCC strains, and evaluate the antiadherent effect of *Hymenaea martiana* Hayne against strains of *S. aureus*. In the evaluation of antimicrobial activity, or the determination of minimum bactericidal concentration, was used microtiter plates containing Mueller-Hinton broth and after incubation of the material with the use of a replicator, aliquots were plated on petri dishes containing Mueller-Hinton agar, followed by further incubation of. It was observed that *A. cearensis* inhibited 80% of the samples *S. aureus*, 4,2% of *Salmonella* spp., but had no effect in samples of *E. coli*. *H. martiana* inhibited 100% of the samples of *S. aureus*, 33% of *Salmonella* spp. and also had no effect on isolated *E. coli*. Regarding the activity nonstick, by obtaining the absorbance in microplate reader held in the 595nm, it was observed that the extract of *H. martiana* showed 60% reduction in biofilm consolidated, and all concentrations exhibited inhibition in biofilm formation. It was concluded that the ethanol extracts of *H. martiana* Hayne and *A. cearensis* A. C. Smith showed antimicrobial activity against *S. aureus* and *Salmonella* spp., but not on *E. coli* and the extract of *H. martiana* Hayne showed antiadherent activity against strains of *S. aureus*. Therefore, it is suggested that the natural antimicrobial and antiadherent can offer advantages to the food area, favoring the hygienic quality and shelf life of products.

**Keywords:** Biofilm. Foodborne diseases. Natural products. Pathogens. Vegetable antimicrobial.

## 1. INTRODUÇÃO

Oferecer segurança alimentar é garantir o consumo de alimentos com características essenciais, representadas pelos atributos nutricionais, aspectos sensoriais desejáveis, ausência de micro-organismos e de riscos físicos e químicos (BENITES e OLIVEIRA, 2004; DUTCOSKY, 2011). Entretanto, as doenças transmitidas por alimentos (DTA) ainda representam um relevante problema de saúde pública em todo o mundo. Isto se dá em decorrência do crescente número de surtos relacionados ao consumo de alimentos contaminados, mesmo com o desenvolvimento constante de métodos que assegurem a qualidade higiênico-sanitária dos produtos alimentícios (ALTEKRUSE et al., 1997; AKUTSU et al., 2005; BRASIL, 2010).

Na indústria de alimentos, os biofilmes microbianos são pontos de contaminação constantes, podendo prejudicar a qualidade microbiológica de matérias-primas, produtos pré-acabados e acabados. Fato este que promove a redução do tempo de prateleira dos produtos e corrobora com o desencadeamento das DTA. Este agravante faz com que seja de grande importância o conhecimento de novas estratégias de controle, econômicas e eficazes, voltadas para a eliminação de mais esta possibilidade de introdução de micro-organismos na cadeia alimentar (FLACH et al., 2005; HERRERA et al., 2007; FUSTER-VALLS et al., 2008; BOARI et al., 2009).

Essa realidade faz com que os consumidores se preocupem em buscar no mercado alimentos que proporcionem segurança alimentar dentro e fora do ambiente domiciliar. Simultaneamente, percebe-se uma maior procura por alimentos que apresentem ingredientes naturais, e que sejam livres de aditivos e/ou conservantes químicos (LEONCIO e BARTOLOZO, 2003; EMBRAPA, 2011).

Diversos métodos podem ser empregados no intuito de garantir a inocuidade do alimento. Porém, a atual demanda de comercialização de alimentos seguros tem despertado o interesse no desenvolvimento de novas tecnologias. Neste sentido, a utilização de produtos naturais, que possam ser aplicados sozinhos ou combinados com outro método que garanta também o seu valor nutricional, está gradativamente ganhando espaço.

Estudos voltados à investigação no que diz respeito às possibilidades de aplicação de antimicrobianos naturais, em produtos alimentícios, enfatizam que os de origem vegetal têm ganhado destaque. Estes, além de demonstrarem a capacidade de melhorar a estabilidade oxidativa destes produtos, promovendo o aumento da vida útil, podem também inibir naturalmente micro-organismos patogênicos. Desta forma, extratos e óleos essenciais de plantas

vêm demonstrando ser uma excelente opção na atividade antimicrobiana e antiaderente, incluindo os patógenos de interesse na área de alimentos (PEREIRA et al., 2006; FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2010; EMBRAPA, 2011).

Pesquisas a respeito da biodiversidade e do potencial econômico da flora brasileira comprovam a sua riqueza em plantas com potencial medicinal. Sendo assim, a constante busca de informações sobre as suas possibilidades de utilização tem desempenhado um papel fundamental na descoberta de novos produtos (JACOBSON et al., 2005).

A Caatinga, único bioma exclusivamente brasileiro, é o mais importante tipo de vegetação do semiárido do Nordeste brasileiro (NOVELY, 1982; BRASIL, 2003). Diversas espécies de plantas deste bioma são conhecidas e utilizadas na medicina popular e na produção comercial de produtos fitoterápicos há vários anos, o que demonstra a sua potencialidade como fonte de material a servir como objeto de estudo em pesquisas a respeito dos efeitos inerentes aos constituintes dos materiais vegetais.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 SEGURANÇA ALIMENTAR**

Uma alimentação adequada auxilia na promoção da saúde, sendo um dos fatores responsáveis pelo desenvolvimento físico, mental e intelectual dos indivíduos. Assim, a qualidade do alimento consumido é preocupação mundial, sendo cada vez maior a busca por alimentos livres de agentes que possam pôr a saúde em risco (LEONCIO e BARTOLOZO, 2003; VALENTE e PASSOS, 2004; TORRES, 2008).

A qualidade do alimento, por sua vez, compreende três aspectos fundamentais: nutricional, sensorial e microbiológico, sendo o aspecto sensorial o mais relacionado à escolha do produto. Pode-se então dizer que alimento de qualidade é aquele que atende às necessidades do consumidor em termos de conveniência, propriedades funcionais, nutritivas e higiênico-sanitárias, respeitando a legislação pertinente e informando sobre os cuidados e métodos de preservação, de preparo e de consumo (BENITES e OLIVEIRA, 2004; DUTCOSKY, 2011).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO/FAO, 2009), define-se segurança dos alimentos como o grau de confiança que o alimento não causará doença ou dano ao consumidor quando é preparado, servido e consumido de acordo com a sua utilização.

Percebe-se que a globalização tem alterado a economia e os costumes, modificando os padrões de competitividade. Em consequência disso, e de um maior acesso às informações relacionadas ao direito do consumidor e da disponibilidade de legislações, verifica-se um aumento no nível de exigência em relação ao consumo de produtos com qualidade garantida. Dessa forma, a indústria alimentícia tem investido na produção de alimentos que apresentem vida longa de prateleira e ao mesmo tempo sejam inócuos (LEONCIO e BARTOLOZO, 2003; EMBRAPA, 2011).

O fornecimento de alimentos seguros envolve também conhecimento e uso de uma manipulação adequada, seguindo os princípios de Boas Práticas de Fabricação (BPF), que englobam os princípios e procedimentos necessários à produção de alimentos. Já que práticas de higiene são pré-requisitos para outros sistemas, como a análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC) (LEVINGER, 2005).

### **2.2 DOENÇAS DE TRANSMISSÃO ALIMENTAR**

Apesar dos avanços nas tecnologias de controle de micro-organismos, as doenças transmitidas por alimentos (DTA) ainda representam um relevante problema de saúde pública

em todo o mundo. Isto pode ser em decorrência de fatores como o constante aumento das populações, um processo de urbanização desordenado, a necessidade de produção de alimentos em grande escala, a existência de grupos populacionais vulneráveis ou mais expostos, além de novos hábitos sociais e mudanças no padrão de consumo alimentar (ALTEKRUSE et al., 1997; AKUTSU et al., 2005; BRASIL, 2010).

Ressalta-se ainda que estas alterações resultaram em uma maior exposição a alimentos destinados ao pronto consumo, no consumo de alimentos em vias públicas, na utilização de novas modalidades de produção, no aumento do uso de aditivos e conservantes, dentre outros (BRASIL, 2010; TAUXE et al., 2010).

A Resolução RDC n 12 da ANVISA, de 2 de janeiro de 2001, define doença transmitida por alimento, como sendo, aquela “causada pela ingestão de um alimento contaminado por um agente infeccioso específico, ou pela toxina por ele produzida, por meio da transmissão desse agente ou de seu produto tóxico” (BRASIL, 2001).

Nos últimos anos, milhões de pessoas no mundo apresentaram alguma DTA. Neste contexto, a Organização Mundial de Saúde (OMS) afirma que mais de 60% das enfermidades relatadas são de origem alimentar, provocados especialmente por agentes microbiológicos presentes nos alimentos (SOUZA, 2010; DEON, 2012).

De acordo com o Manual Integrado de Prevenção e Controle de Doenças Transmitidas por Alimentos (BRASIL, 2010), existem atualmente mais de 200 tipos de doenças causadas pela ingestão de alimentos e/ou água contaminados com agentes bióticos e abióticos, tais como: bactérias, vírus, parasitas, *prions*, toxinas produzidas por micro-organismos, agrotóxicos, produtos químicos e metais pesados.

Estes agentes podem entrar na cadeia alimentar em diferentes etapas. Por isso, falhas no processamento, na distribuição e/ou na conservação do produto podem permitir a sobrevivência, multiplicação e/ou produção de compostos tóxicos por micro-organismos. Além disso, a manipulação do alimento feita de forma inadequada e a contaminação após o preparo também são importantes causas de surtos de doenças de origem alimentar. Estando em contato com o alimento, a sobrevivência e a multiplicação do agente etiológico dependem de seus mecanismos de defesa e das condições do meio, representadas principalmente pelos níveis de oxigenação, pH e temperatura, que podem variar de acordo com o produto (HAVELAAR et al., 1994; GIOVA, 1997; OLIVEIRA et al., 2010; BRASIL, 2010).

Segundo dados da Vigilância Epidemiológica das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar no período de 2000 a 2011 (BRASIL, 2011), ocorreram no Brasil 8.663 surtos de

DTA, onde 163.425 pessoas ficaram doentes e 112 foram a óbito. Além disso, deste total de surtos, 3.927 foram ocasionados por bactérias, vírus, parasitas e compostos químicos. Já os agentes etiológicos mais identificados foram: *Salmonella* spp., *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *E. coli*, *Campylobacter* spp., *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Shigella* spp., *Vibrio cholerae* O1, *Vibrio parahaemolyticus*, *Cryptosporidium* spp., Rotavírus, Norovírus, Hepatite A, *Enterobacter* spp., *Toxoplasma gondii*, Giardia e *Trypanosoma cruzi*. Porém, Brasil (2010) destaca a atuação de *E. coli* O157:H7, *Streptococcus zooepidermidis* e ácido domóico (neurotoxina que provoca envenenamento amnésico por mariscos).

Uma DTA genericamente é caracterizada por anorexia, náuseas, vômitos e/ou diarreia acompanhada ou não de febre. Porém, podem ocorrer afecções em diferentes órgãos e sistemas, tais como meninges, rins, fígado, sistema nervoso central, terminações nervosas periféricas e outros, de acordo com o agente envolvido. Na maioria dos casos, a duração dos sintomas pode variar de poucas horas até mais de cinco dias, dependendo do estado físico do paciente, do tipo e da quantidade de micro-organismo ingerido (BRASIL, 2005; MÜRMAN et al., 2008; BRASIL, 2010; FORSYTHE, 2010).

Geralmente a DTA é autolimitante, mas há exceções, sendo crianças, gestantes, idosos e indivíduos imunodeprimidos os mais propensos. No entanto, todos estão suscetíveis. A maioria dos surtos tem sido relacionada à ingestão de alimentos com boa aparência, sabor e odor normais, ou seja, sem qualquer alteração sensorial visível. Este fato dificulta a rastreabilidade dos alimentos envolvidos, uma vez que os consumidores afetados dificilmente conseguem identificar os alimentos fonte da contaminação (BRASIL, 2005; CDC, 2006; OLIVEIRA et al., 2010; BRASIL, 2010).

Também de acordo com o Manual Integrado de Prevenção e Controle de Doenças Transmitidas por Alimentos (BRASIL, 2010), pode-se agrupar as DTA nas seguintes categorias: Infeções – Relacionadas à ingestão de micro-organismos patogênicos que possuem capacidade de penetrar e invadir tecidos. Ex: *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica* e *Campylobacter jejuni*; Toxinfecções – Provocadas por toxinas liberadas pelos micro-organismos toxigênicos quando há multiplicação, esporulação e lise na luz intestinal. Ex: *E. coli* enterotoxigênica, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Clostridium perfringens* e *Bacillus cereus* (cepa diarreica); Intoxicações – Ocorrem através da ingestão de toxinas pré-formadas no alimento. Ex: *S. aureus*, *B. cereus* (cepa emética) e *Clostridium botulinum*; Intoxicações não bacterianas – Nestes casos há o envolvimento de metais pesados, agrotóxicos, fungos silvestres, plantas e animais tóxicos (Ex.: moluscos, peixes).

Podem existir outras abordagens em relação a estas categorias. Por exemplo, de acordo com Germano e Germano (2011), uma toxinfecção trata-se de um quadro gastroentérico causado por micro-organismos patogênicos veiculados por um alimento contaminado. De acordo com os autores, quando uma manifestação clínica está no início é difícil diferenciar uma infecção de uma intoxicação apenas com base no quadro clínico. Além disso, caracterizam uma infecção como sendo a ingestão de células microbianas intactas, mas que podem liberar toxinas durante sua multiplicação no hospedeiro.

Diferentes tipos de alimentos são relacionados às causas de DTA, sendo de acordo com Brasil (2011), os mais relatados em casos de surtos de 2000 a 2011: frutas, hortaliças, carne bovina *in natura*, carne de frango, carne suína *in natura*, ovos e preparações à base de ovos, pescados, leite e derivados, cereais e outros.

### **2.2.1 *Salmonella* spp.**

São anaeróbias facultativas, produzem gás a partir de glicose (com exceção de *S. typhi*) e possuem pH ótimo próximo de 7,0. A temperatura ideal para multiplicação é de 35°C a 37°C, sendo a mínima de 5°C e a máxima de 47°C, mas vários estudos relacionam estes valores ao sorotipo da *Salmonella* (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

As bactérias do gênero *Salmonella* possuem grande distribuição no ambiente, sendo normalmente encontradas no trato intestinal de aves e répteis. A *Salmonella* spp. tem sido bastante isolada em alimentos de origem animal e derivados, representando um problema para a saúde pública. A partir de estudos epidemiológicos realizados em vários países, as salmonelas foram incluídas entre os agentes patogênicos mais frequentemente associados à DTA (FEITOSA, 2003; CERESER et al., 2011).

Alguns estudos comprovam a participação deste micro-organismo em grande quantidade de surtos ao redor do mundo. Hughes et al. (2007) na Inglaterra e País de Gales, de 1992 a 2003, demonstrou que *Salmonella* spp. foi responsável por 52% dos surtos ocorridos. Na Áustria, de acordo com Much et al. (2007), de um total de 606 surtos alimentares registrados em 2005, 76% foram causados por *Salmonella* spp. Neste mesmo ano, de acordo com Vaillant et al. (2005), em pesquisa realizada na França, *Salmonella* spp. foi a principal causa de hospitalização e de morte por gastroenterite bacteriana confirmada em laboratório. Em estudo realizados por Greig e Ravel (2009), a partir de relatórios publicados de surtos no período entre 1988 e 2007, foi relatado que

nos 4.093 casos de DTA ocorridos nos EUA, Canadá, União Europeia, Austrália, Nova Zelândia e outros países, destes, 70% foram causados por *Salmonella* spp., Norovírus e *E. coli*.

### **2.2.2 *Staphylococcus aureus***

*S. aureus* é citado como um importante patógeno devido a fatores como virulência, resistência aos antimicrobianos e associação a doenças sistêmicas potencialmente fatais, infecções cutâneas e oportunistas e intoxicação alimentar (LOWY, 1998).

Os micro-organismos do gênero *Staphylococcus* são anaeróbios facultativos, com maior crescimento em condições aeróbias. Dentre as espécies deste gênero, destacam-se como de importância na área de alimentos: *S. aureus*, *S. hyicus*, *S. chromogens* e *S. intermedius*. O *S. aureus* é o mais importante e o mais relatado em casos de surtos, causando intoxicação a partir da ingestão de enterotoxinas pré-formadas no alimento. Além disso, pode ser isolado no ambiente, na pele e mucosa do homem e de animais. Com exceção de *S. chromogens*, todas as espécies são coagulase e termonuclease positivas (FAGUNDES e OLIVEIRA, 2004; BORGES et al., 2008; FRANCO e LANDGRAF, 2008).

Estafilococos são bactérias mesófilas, Gram-positivas, apresentando temperatura de crescimento na faixa de 7°C a 47,8°C e suas enterotoxinas são produzidas entre 10 °C e 46 °C, com o ótimo entre 40°C e 45°C, portanto, surtos de intoxicação alimentar são provocados por alimentos que permaneceram neste intervalo por tempo variável, de acordo com o nível de inóculo e temperatura de incubação. Em geral, quanto mais baixa for a temperatura, maior o tempo necessário para a produção da enterotoxina, que em condições ótimas torna-se evidente em quatro a seis horas (FRANCO e LANDGRAF, 2008).

### **2.2.3 *Escherichia coli***

Bacilo Gram-negativo, não esporulado e capaz de fermentar glicose com produção de ácido e gás. Esta bactéria pode ser encontrada no trato intestinal do homem e de animais. Os coliformes termotolerantes possuem a *E. coli* como a principal espécie representante, sendo utilizada como indicador higiênico-sanitário, uma vez que é de fácil isolamento nos meios de cultura convencional e mais resistente por um período de tempo maior (ICMSF, 2000).

Algumas cepas conseguem se multiplicar em temperaturas entre 7 e 46°C e têm uma temperatura ótima de crescimento entre 35 e 40°C, mas cepas patogênicas geralmente sobrevivem às temperaturas de refrigeração (GERMANO e GERMANO, 2011).

Com base nos fatores de virulência, manifestações clínicas e epidemiologia, as linhagens de *E. coli* patogênicas são, atualmente, agrupadas em cinco classes: EPEC (enteropatogênica clássica); EIEC (enteroinvasiva); ETEC (enterotoxigênica); EHEC (entero-hemorrágica); e EAggEC (enteroagregativa). Estas cepas são comumente descritas como responsáveis por surtos relacionados ao consumo de alimentos contaminados (FRANCO e LANDGRAF, 2008; SAIDENBERG, 2008).

Nos EUA, desde 1998 os legumes frescos têm sido responsáveis por pelo menos 12 surtos relacionados à contaminação por *E. coli* O157:H7 ou *Salmonella* spp. (TAUXE et al., 2010).

## 2.3 BIOFILME MICROBIANO

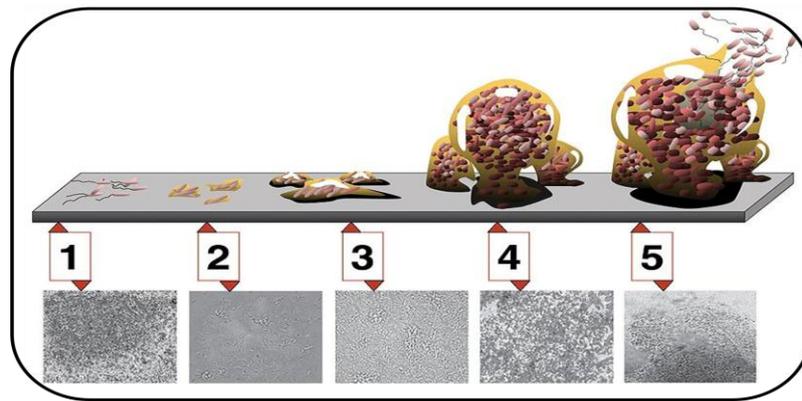
Estas estruturas são comunidades microbianas constituídas de células livres (planctônicas) que se aderem a uma superfície, proliferam e se acumulam em camadas (células sésseis) imersas em uma matriz de exopolissacarídeo que é formada durante esse processo (DONLAN e COSTERTON, 2002).

Além de ser constituída por polissacarídeos, proteínas e lipídeos, a matriz exopolissacarídica pode conter também água e ácidos nucleicos. Já o biofilme como um todo, é formado também por água e resíduos do ambiente (biótico ou abiótico) em que as células microbianas se aderem (SUTHERLAND, 2001; CAPELLETI, 2006; LUCCHESI, 2006). Porém, a adesão e a formação do biofilme são dependentes de características do micro-organismo, como expressão de fatores de virulência e produção da cápsula exopolimérica. A superfície aderente e outros fatores como pH, temperatura, tempo de agitação, dentre outros, também influenciam na formação destas estruturas (FLACH et al., 2005; BOARI, 2008; CAIXETA, 2008).

O biofilme pode ser monoespécie (formado por apenas um tipo de micro-organismo) ou multiespécie. Os monoespécie têm maior ocorrência em tecidos orgânicos, como válvulas cardíacas, já os multiespécie são mais relacionados à área de alimentos, onde se utilizam de outras superfícies (O'TOOLE et al., 2000).

### 2.3.1 Formação de biofilme microbiano

As principais etapas envolvidas na formação de um biofilme microbiano são (Figura 1): Formação do filme condicionador (1); Adesão inicial dos micro-organismos (2); Produção de substâncias poliméricas extracelulares (3); Maturação (4) e Desprendimento de porções (5).



Fonte: [www.blogdobiomolgroup.com](http://www.blogdobiomolgroup.com)

**Figura 1:** Etapas de formação de biofilme microbiano.

A formação do filme condicionador ocorre a partir da adsorção da matéria orgânica na superfície e a adesão dos micro-organismos primários é controlada principalmente por interações iônicas entre a parede celular dos micro-organismos e macromoléculas do filme condicionador (CAPELLETTI, 2006).

Estruturas como flagelos, fímbrias e pili também desempenham papel fundamental na adesão celular inicial e na formação de pontes entre a superfície e as células, pois a hidrofobicidade é mediada por fatores de virulência associados a estas estruturas e, pela membrana externa em Gram-negativos (FLACH et al., 2005; SOUSA, 2005).

Nesta fase há o transporte das bactérias do fluido circundante para o material sólido em contato com este meio, ocorrendo a interação célula-superfície reversível, pois algumas ainda podem retornar ao estado planctônico, apesar da produção de polímeros formadores da matriz serem ativados aproximadamente 15 minutos depois da interação (OULAHAL et al., 2008).

O crescimento e a divisão celular acontecem após a adesão inicial, ocasionando a formação do biofilme (adesão irreversível), que ocorre em aproximadamente duas horas. Em seguida ocorre a maturação, onde há um rearranjo estrutural do biofilme, a redistribuição das bactérias e o aparecimento de canais e poros onde há difusão de nutrientes, produção de grandes quantidades de substâncias poliméricas extracelulares e aumento da densidade celular (CAPELLETTI, 2006; CHENG et al., 2007).

Depois de maduro, porções do biofilme se desprendem por mecanismos que podem ser físicos, químicos ou biológicos. Como exemplos de mecanismos físicos pode-se citar a erosão superficial, abrasão ou formação de gases. Já os mecanismos químicos envolvem a participação de agentes antimicrobianos, mudanças de pH, quelação de cátions polivalentes ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e variações nas propriedades químicas do substrato. O desprendimento por causa biológica pode

ocorrer pela transição das células sésseis a planctônicas, provocada pela escassez de nutrientes, relacionada ao aumento da densidade do biofilme; da divisão celular com a excreção de enzimas por algumas espécies; ou pelo ataque de predadores, como os protozoários (STOODLEY et al., 2002; MORAES, 2009).

Em todas as etapas de formação do biofilme as bactérias se comunicam através do *Quorum-sensing*, um sistema que por meio de sinais químicos secretados pelas células bacterianas, participa na capacidade de percepção da densidade populacional e promove a regulação da expressão genética. A produção e difusão de moléculas sinalizadoras (autoindutoras - AIS) através das membranas permite a coordenação do comportamento bacteriano em relação ao meio ambiente, regulando a expressão de genes especializados, por exemplo, no controle de processos fisiológicos como a esporulação, indução de fatores de virulência, produção de bacteriocinas e de antibióticos, a bioluminescência e a produção de biofilmes (SCHAUDER e BASSLER, 2001; SMITH e IGLEWSKI, 2003; RUMJANEK et al., 2004; AMMOR et al., 2008; BAI e RAI, 2011).

Importantes também no processo de adesão inicial e colonização da superfície, principalmente para micro-organismos gram-negativos são o pili e os flagelos. O Pili tipo IV pode se ligar a uma grande variedade de superfícies onde se tem adesão célula-célula. Os flagelos são utilizados para locomoção através de uma extensão da membrana externa, sendo constituídos por unidades de flagelina. Em meios aquosos, alguns micro-organismos apresentam um flagelo polar, que após a adesão inicial é substituído por um flagelo lateral promovendo maior capacidade de locomoção (BOARI, 2008).

Dentre os fatores que contribuem para a formação, citam-se: pH- Os micro-organismos podem ser classificados em acidófilos, neutrófilos e basófilos, de acordo com a taxa de crescimento e o pH do meio, sendo a maioria dos biofilmes formados em pH em torno de 7 (PEREIRA, 2001); Temperatura- Relacionada às temperaturas ótimas intrínsecas aos micro-organismos (STAINER et al., 1995). Como exemplos, a temperatura ideal para multiplicação de *Salmonella* spp. é de 35°C a 37°C, a de *S. aureus* de 40°C e 45°C e a de *E. coli*, 35 e 40°C; Concentração de nutrientes do meio - Quanto maior a concentração de nutrientes disponíveis, maior será o crescimento microbiano e maior será a diversidade de micro-organismos na composição do biofilme; Tipo da superfície – Locais porosos e irregulares favorecem a multiplicação bacteriana. Além disso, a má conservação da superfície pode ser um fator importante na formação do biofilme (CHAVES, 2004).

### 2.3.2 Importância dos biofilmes na área de alimentos

Os biofilmes podem acarretar vários problemas na área de alimentos, já que a colonização das superfícies em indústrias pode contaminar os produtos, alterando suas características, além de possibilitar uma DTA, representando riscos à saúde do consumidor e prejuízos financeiros à indústria com a diminuição do tempo de vida útil dos produtos (FLACH et al., 2005).

Como o sistema de comunicação entre as bactérias pode desencadear a expressão genética, relaciona-se a participação de moléculas sinalizadoras na regulação de fenótipos envolvidos na deterioração de alimentos e no desencadeamento de toxinfecções alimentares. Isto se deve ao fato de já ter sido detectada a presença de AHLs em produtos cárneos, estando nestes casos, envolvida na atividade proteolítica (CHRISTENSEN et al., 2003; SMITH et al., 2004; VIANA, 2006).

A topografia da superfície de locais onde ocorre a manipulação de alimentos merece atenção redobrada, pois micro-ranhuradas e microfendas podem favorecer a formação de biofilmes, já que dificultam a higienização no local. Além disso, o desprendimento de células pode desencadear a formação de novo biofilme, aumentando os focos de contaminação (CAIXETA, 2008).

Na indústria de beneficiamento de leite, práticas inadequadas de manejo e de higienização em equipamentos de ordenha e no beneficiamento, assim como a conservação inadequada, tornam o leite suscetível à contaminação. Além disso, estas práticas inadequadas podem promover a formação de biofilmes em tanques de armazenamento e trocadores de calor, e ainda, adesão de esporos na superfície de embalagens (FRANCO et al., 2000; HAUN, 2004).

Outro fator importante é que quando em forma de biofilme, os micro-organismos são mais resistentes aos materiais utilizados para a limpeza e sanitização. Relaciona-se a isto a membrana exopolimérica formada, que pode funcionar como uma barreira protetora, a possível interação entre o agente antimicrobiano com a matriz, a resistência mediada por enzimas, níveis de atividade metabólica dentro da estrutura, dentre outros fatores. A composição da membrana externa da parede celular das bactérias, também exerce um papel importante na resistência à penetração das substâncias ativas dos biocidas (PEREIRA, 2001; CAIXETA, 2008). De acordo com Drenkard (2003), os micro-organismos em biofilme são de quinhentas a mil vezes mais resistentes do que as em estado livre.

Diante das dificuldades em eliminar os biofilmes, torna-se relevante conhecer as condições que propiciam a formação e as fragilidades dos agregados microbianos para o

desenvolvimento de estratégias de controle, voltadas para a sua eliminação, auxiliando na obtenção de um produto de qualidades nutricionais, sensoriais e higiênico-sanitárias (FORSYTHE, 2002; HERRERA et al., 2007; CAIXETA, 2008).

### **2.3.3 Biofilme de *Staphylococcus aureus***

Dentre os micro-organismos relacionados à formação de biofilmes, *Staphylococcus aureus* merece destaque, sendo a proliferação de suas células para aderir e formar biofilme mediada pela produção intracelular de adesina. Esta síntese é codificada pelo gene produto do locus *ica* do operon *icaABCD*, que é fundamental para a formação de biofilmes e expressão de virulência dos micro-organismos, e regulados em resposta a fatores ambientais como glicose, anaerobiose, alta osmolaridade e temperatura, limitação de etanol e ferro (O'TOOLE et al., 2000).

Mesmo na ausência do locus *ica*, os estafilococos são capazes de aderir à superfície do substrato, mas não são capazes de construir um biofilme de várias camadas, devido a um defeito na adesão célula-célula (BLANCO, 2005).

Estudo realizado por Cramton et al. (1999), mostrou que o *S. aureus* e o *Staphylococcus epidermidis* possuem o locus *ica*, que codifica as funções para a adesina intracelular, sugerindo que os estágios iniciais de formação do biofilme podem ser semelhantes para os dois micro-organismos.

## **2.4 ETNOBOTÂNICA**

Citada como um dos caminhos alternativos que mais evoluiu para a descoberta de produtos naturais bioativos, a etnobotânica é objeto de estudo em todo o mundo. No Brasil, diversas áreas de investigação tentam resgatar o conhecimento popular a respeito dos vegetais e seus usos, especialmente o medicinal (MING et al., 2000; MACIEL et al., 2002).

De acordo com a ANVISA, através da RDC n 14, de 31/03/2010 (BRASIL, 2010), planta medicinal é toda espécie vegetal, cultivada ou não, utilizada com propósitos terapêuticos. Plantas com características medicinais são utilizadas em muitas culturas há milhares de anos para diferentes fins. Estima-se que no mercado mundial, cerca de 50% das plantas são usadas na alimentação, 25% em cosméticos, 20% pela indústria farmacêutica e 5% em outras atividades (CAÑIGUERAL et al., 2003; EMBRAPA, 2011; SILVA, 2012).

No Brasil, a miscigenação cultural possibilitou o surgimento de uma farmacopeia popular baseada em plantas medicinais. Com a introdução de espécies exóticas pelos colonizadores e

escravos, o país tornou-se o maior detentor da diversidade vegetal do mundo, com aproximadamente 55 mil espécies de plantas superiores catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000 (ENGELKE, 2003; CAMPELO, 2006).

A Caatinga é o mais importante tipo de vegetação do Semiárido do Nordeste brasileiro, sendo dominado por espécies herbáceas anuais e espécies lenhosas arbustivas. De um patrimônio biológico bastante diversificado, com ocorrência de espécies endêmicas e uma riqueza de espécies vegetais e animais, é o único bioma exclusivamente brasileiro (NOVELY, 1982; BRASIL, 2003).

Este bioma abrange uma vasta área no Nordeste brasileiro, ocupando aproximadamente 826.411 Km<sup>2</sup>. Sendo representado por pelo menos 10% do território brasileiro e 60% da região Nordeste, incluindo parte dos estados do Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e Minas Gerais (SILVA e ALBUQUERQUE, 2005; BRASIL, 2010).

Diversas espécies de plantas da Caatinga são amplamente conhecidas e utilizadas na medicina popular e na produção comercial de produtos fitoterápicos. Neste sentido, é crescente o número de estudos sobre plantas medicinais da região semiárida do Nordeste do Brasil.

Em geral, diferentes partes das plantas podem ser utilizadas, como: folhas, flores, fruto, caule e raiz, e estas podem ser preparadas de diversas formas. Entretanto, para que se tenha um melhor resultado é importante saber qual a parte contém maior concentração do princípio ativo (SOUZA et al., 2010; EMBRAPA, 2011; SILVA, 2012).

#### **2.4.1 Compostos bioativos**

Nas plantas, o metabolismo é dividido em primário (ou de macromoléculas) e secundário (ou de micromoléculas), sendo o primário entendido como um conjunto de processos metabólicos que desempenham uma função essencial, como a fotossíntese, a respiração e o transporte de solutos. Os compostos envolvidos neste caso são os aminoácidos, os nucleotídeos, os lipídios, os carboidratos e a clorofila (PERES, 2004).

Já a atividade metabólica secundária permite que os vegetais sejam capazes de produzir substâncias utilizadas como mecanismo de defesa contra predação por micro-organismos, insetos, herbívoros e outros causadores de estresse. Além disso, alguns destes metabólitos constituem importantes compostos que absorvem a luz ultravioleta, evitando que as folhas sejam danificadas (GOTTLIEB, 1981; LI et al., 1993; FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2010).

Estes produtos secundários são considerados substâncias químicas que não atuam diretamente na fisiologia da planta, mas que contribuem para conferir vantagens adaptativas e interação com os ecossistemas. Podem desempenhar diversos efeitos, como antibióticos, antifúngicos, antimicrobianos, antivirais e também apresentar atividades antigermativas ou tóxicas para outras espécies vegetais (LI et al., 1993). Dessa forma, de acordo com Neto e Caetano (2005), em analogia aos mamíferos, pode-se dizer que representam o sistema imunológico das plantas, de fundamental importância para a sobrevivência.

Estes metabólitos, também chamados de fitonutrientes, são utilizados há séculos na medicina popular devido às suas atividades biológicas. Atualmente, são relacionados aos cosméticos, medicamentos, à matéria-prima para a química ou ainda, aos alimentos ou componentes alimentícios com indicação médica ou de saúde (nutracêuticos) (SALVARO, 2009; FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2010).

No entanto, o teor de metabólitos está relacionado a fatores como o crescimento da planta no ambiente, a técnica da colheita utilizada, o ciclo vegetativo e as partes escolhidas, as condições de solo e sazonalidade (BOUADBELLI et al., 2012).

Importante também é o que diz respeito aos micro-organismos testados. Os diferentes padrões de resistência apresentados pelas cepas dos micro-organismos, a origem da sua obtenção (isolamento) e características inerentes ao gênero em questão podem influenciar no efeito inibitório do material testado (OSTROSKY et al., 2008).

Para SIVROUPOULOU et al. (1995), as diferenças nas técnicas empregadas para investigação da ação de compostos de plantas e a grande variação encontrada na composição química de algumas preparações vegetais podem resultar em dados de difícil comparação entre as pesquisas.

#### **2.4.1.1 Principais metabólitos secundários**

Os metabólitos secundários de plantas, de acordo com Neto e Caetano (2005), podem ser divididos em: compostos fenólicos, terpenoides, compostos nitrogenados e cumarinas.

##### Compostos fenólicos

Também chamados de fenóis, são citados como os principais responsáveis pelas propriedades antibacterianas, sendo derivados do ácido chiquímico, formado por dois metabólitos da glicose, o fosfoenolpiruvato e a eritrose-4-fostato, ou do ácido mevalônico. Comuns a todas as

plantas superiores, são atrativas aos seres humanos e outros animais devido às características sensoriais que apresentam, tais como odor, sabor e coloração.

Alguns destes compostos são bastante empregados na indústria de alimentos, como o aldeído cinâmico da canela (*Cinnamomum zeyllanicum*) e a vanilina da baunilha (*Vanilla planifolia*) (CROTEAU et al., 2000; PERES, 2004; TURINA et al., 2006; FUMAGALI, 2008; SILVA, 2012).

Os **taninos** são bastante encontrados nas plantas e se localizam em folhas, ramos, cascas e frutos verdes. Atuam na proteção contra ataques de insetos-praga e de alguns micro-organismos patogênicos às plantas, podendo ser utilizados como dissuasórios alimentares (VON POSER e MENTZ, 2003).

Os **flavonoides** participam na proteção contra raios ultravioleta e na sinalização entre plantas e outros organismos, sendo a coloração das flores um dos principais atrativos, através de antocianinas e antocianidina. Podem ser encontrados em diversos alimentos, como café, milho, chocolate, caju, manga, maçã, dentre outros, e apresentam atividades como anti-inflamatória, antiviral, antiarteroesclerótica, antiofídica, antioxidante e antitumoral, além de atuarem como hepatoprotetores (CROTEAU et al., 2000; PERES, 2004; SANTOS et al., 2008; NETO e CAETANO, 2005).

### Terpenoides

Estes compostos são elaborados a partir do ácido mevalônico, no citoplasma, ou do piruvato e 3-fosfoglicerato, no cloroplasto. Também chamados de terpenos, podem ser encontrados em diversos grupos de plantas medicinais, sendo divididos, em relação ao número de carbonos que apresentam em: monoterpenoides (10C), sesquiterpenoides (15C), diterpenoides (20C), triterpenoides (30C), tetraterpenoides (40C) e politerpenoides (>40C) (NETO; CAETANO, 2005; SILVA, 2012).

Os **monoterpenoides** e os **sesquiterpenoides** são geralmente óleos essenciais encontrados em flores, bastante utilizados na perfumaria. Muitos dos **diterpenoides** apresentam atividade contra o câncer e glaucoma, sendo o taxol (principal anticancerígeno) e o ácido caurenico (ativo contra formas tripomastigotas de *Trypanossoma cruzi in vivo*) os principais dessa classe. Os **triterpenoides** são encontrados principalmente como constituintes do látex e de resinas. Diversos trabalhos relacionam os triterpenoides com atividades anti-inflamatória,

anticancerígena e antimicrobiana. Os **tetraterpenoides** são representados pelos carotenoides, pigmentos coloridos de grande importância como antioxidantes (NETO e CAETANO, 2005).

### Compostos nitrogenados

Os **alcaloides** são derivados de aminoácidos aromáticos (triptofano e tirosina), que são derivados do ácido chiquímico e também de aminoácidos alifáticos (ornitina, lisina). Foram os primeiros compostos isolados de plantas e utilizados como analgésico e dentre os mais potentes está o ópio (morfina) isolado da papoula (*Papaver somniferum*), utilizado até os dias atuais (CROTEAU et al., 2000; SILVA, 2012).

Vários alcaloides são tóxicos aos insetos e atuam como repelente para herbívoros, o que pode ser justificado pela variedade de efeitos fisiológicos que exercem, além de suas atividades antimicrobianas (CROTEAU et al., 2000; FUMAGALI, 2008).

### Cumarinas

Com derivação do ácido cinâmico, apresentam atividades antiviral, antimicrobiana, anti-inflamatória, antiespasmódica, antitumoral e antioxidante. A cumarina simples apresenta também propriedades anticoagulantes (inibindo a ativação de vitamina K) e bronco-dilatadoras. Mais de 1300 cumarinas já foram identificadas de fontes naturais, especialmente de plantas verdes (PEREIRA, 1992; HOULT e PAYÁ, 1996; RODRIGUES, 2005; MARCOLAN et al., 2008).

O mecanismo de ação dos metabólitos secundários das plantas não está totalmente elucidado, mas geralmente é representado, entre outros fatores, por desintegração da membrana citoplasmática do micro-organismo. Estes compostos são capazes de alterar a permeabilidade da membrana celular, permitindo assim a perda de macromoléculas, podendo levar à sua destruição (SCHENKEL et al., 2001; BURT, 2004; BAJPAI, 2008).

Neste contexto, Kumar e Singh (1984), explicam que esta ação protetora contra agentes patogênicos está relacionada com a capacidade inibitória que possuem sobre enzimas bacterianas celulolíticas e ureolíticas.

#### **2.4.1.2 Utilização de material vegetal em alimentos**

Devido à crescente demanda do uso de ingredientes naturais, os extratos vegetais estão sendo cada vez mais utilizados como uma excelente alternativa para substituir os produtos sintéticos, pois além de possuírem a capacidade de melhorar a estabilidade oxidativa dos produtos alimentícios e, em muitos casos, aumentar a vida útil dos mesmos, podem inibir naturalmente micro-organismos patogênicos responsáveis por DTA (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2010; EMBRAPA, 2011).

As propriedades antimicrobianas de extratos vegetais têm sido estudadas principalmente com relação ao efeito inibidor de micro-organismos patogênicos presentes em alimentos. Um exemplo bastante comum é o estudo de plantas aromáticas utilizadas popularmente como condimento na culinária. O Orégano (*Origanum vulgare* L.) e o Tomilho (*Thymus vulgaris* L.) têm sido objeto de estudo de vários pesquisadores e as ações antibacterianas e antioxidantes dos óleos destas plantas têm sido amplamente demonstradas (STRYCHARZ e SHETTY, 2002; BERTELLI et al., 2003; BURT e REINDERS, 2003; FRATIANNI et al., 2010).

O uso de plantas em alimentos é bastante amplo, principalmente devido aos valores nutritivos associados. Os óleos vegetais também possuem grande utilização na alimentação humana, tanto direta como indiretamente. Os mais utilizados são os de soja, milho, girassol e de oliva. Alguns desses óleos podem ser usados na indústria para a produção de margarina, após um processo de hidrogenação catalítica (SANTOS et al., 2008).

A utilização de especiarias ou condimentos vegetais é outro exemplo bastante comum e seus efeitos antimicrobianos despertam o interesse de vários autores. Neste sentido, pode-se citar alguns exemplos de pesquisas: Nakamura et al. (1999), pesquisando sobre o efeito antimicrobiano de *Ocimum gratissimum* (Manjeriçã), concluíram que seus óleos essenciais, ricos em eugenol, apresentaram ação antimicrobiana contra *S. aureus*.

Ayar et al. (2004) pesquisaram os efeitos antimicrobianos de Orégano e Sálvia (*Salvia fruticosa* L.) em manteiga e observaram que os extratos utilizados inibiram leveduras, micro-organismos proteolíticos e coliformes. Shan et al. (2011) avaliaram o potencial antibacteriano e as propriedades antioxidantes de cinco extratos (Canela em pau, Orégano, Cravo, Romã e Uva) sobre *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *Salmonella enterica* inoculados experimentalmente em queijo e concluíram que tais extratos apresentaram bom potencial multifuncional para a preservação do produto, pois inibiram a multiplicação dos patógenos.

Hsouna et al. (2011) avaliaram o efeito inibitório de óleo essencial (OE) de *Ceratonia siliqua* L. (Alfarroba) contra cepas de *L. monocytogenes* experimentalmente inoculadas em carne

bovina. A atividade antibacteriana do OE foi claramente evidente, mostrando-se um forte inibidor contra os micro-organismos.

Importante ressaltar que algumas espécies vegetais podem também conter compostos tóxicos, potencialmente agressivos à saúde, sendo necessário, antes de sua utilização conhecer os seus constituintes. Deve-se, portanto, utilizá-las com cuidado, respeitando seus riscos toxicológicos. Em contrapartida, o termo "natural" empregado em associação a alguns métodos é muitas vezes mal interpretado, podendo levar à subestimação de riscos decorrentes de uma utilização incorreta (BUCKEL, 1998; GALLO e KOREN, 2001; VEIGA JÚNIOR et al., 2005; CLARKE et al., 2007).

De acordo com a Resolução nº1757/2002 (BRASIL, 2002), que contra-indica o uso de algumas plantas medicinais no âmbito do estado do Rio de Janeiro, os efeitos mais preocupantes do uso indiscriminado de plantas medicinais são o teratogênico, o embriotóxico e o abortivo. Além destes, pode haver ainda efeitos hepatotóxicos, diarreicos, citotóxicos, carcinogênicos e genotóxicos (CAPASSO, 2000; VEIGA JÚNIOR et al., 2005).

Neto e Caetano (2005) descrevem, por exemplo, que a respeito dos taninos, a utilização oral de plantas ricas nesse composto apresenta restrições que devem ser respeitadas, devido a sua alta capacidade adstringente.

Neste contexto, a pesquisa fitoquímica é uma aliada, já que tem por objetivo identificar os constituintes químicos presentes nos vegetais (SIMÕES et al., 2001).

#### 2.4.2 *Amburana cearensis* A. C. Smith



Fontes: [www.floraefaunasertao.blogspot.com](http://www.floraefaunasertao.blogspot.com); [www.ipef.br](http://www.ipef.br)

**Figura 2:** *Amburana cearensis* A. C. Smith.

Também conhecida cientificamente por *Torresea cearensis* A., pertence à família Fabaceae e tem por nomes comuns Cumaru, Amburana de cheiro, Cumaru-do-ceará, dentre outros. Apresenta porte regular, podendo atingir até 10m de altura nas regiões de Caatinga e até 20m na Zona da Mata. Tradicionalmente tem sido utilizada como anti-espasmódico, anti-

inflamatório, antitússico e no tratamento de asma (BRAGA, 1976; CORREA, 1984; SILVA et al., 2007).

Vários compostos foram isolados de *A. cearensis*, incluindo ácido protocatecuico, taninos, cumarina, flavonoides, glucosídeos de fenol e amburosídeos A e B. Além disso, um dos seus metabólitos, o dicumarol, é responsável por sua ação antibacteriana (BRAGA, 1976; CORREA, 1984; BRAVO et al., 1999; CANUTO e SILVEIRA, 2006; MELO et al., 2007). O principal flavonoide da casca do tronco desta espécie, o isocampferídeo, apresentou atividade antibacteriana para *Cladosporium cucumerinum* e *Bacillus cereus* em estudo realizado por Wang et al. (1989) e atividade antiviral contra o poliovírus tipo 1 e o rinovírus tipo 15 (DE MEYER et al., 1991; SAEIDNIA et al., 2005). Os compostos metabólitos encontrados em *A. cearensis* despertam o interesse em avaliar seu potencial como antimicrobiano natural frente a diversos micro-organismos patogênicos.

Neste sentido, Bravo et al. (1999), em pesquisa sobre os seus glicosídeos fenólicos, relataram atividade antimicrobiana contra *E. coli* e *Shigella flexneri*. Já Peixoto (2009), avaliou o potencial de seu extrato etanólico frente a isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos de casos de mastite subclínica e observou atividade antimicrobiana em todos os isolados, incluindo a cepa resistente à Meticilina (MRSA). Em estudo semelhante, Sá et al. (2011) também observaram atividade antimicrobiana de seu extrato frente a cepas de *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Listeria* spp. e *Vibrio* spp.

Estudos realizados para determinar a sua toxicidade demonstraram que para a cumarina, extraída da planta, a DL<sub>50</sub> calculada foi de 300 mg/kg (i.p.), em camundongos. O extrato hidroalcoólico foi avaliado sendo administrado na dose de 500mg/kg (v.o.), durante o período de 30 ou 50 dias, em ratos Wistar machos e fêmeas, não mostrando efeito teratogênico. Além disso, este estudo revelou a baixa toxicidade da planta (DL<sub>50</sub>: 1,79 ± 0,12 g/kg) (DINIZ et al., 1998; LEAL et al., 2003).

Leal et al. (2006) relatam que na avaliação da toxicidade clínica do xarope de “cumaru”, em pacientes voluntários que receberam uma dose diária de 20 mL (cada), durante 30 dias consecutivos, não mostrou alterações nos parâmetros clínico-laboratoriais dos pacientes.

### 2.4.3 *Hymenaea martiana* Hayne



Fontes: [www.belezadacaatinga.blogspot.com](http://www.belezadacaatinga.blogspot.com); [www.biogeodb.stri.si.edu](http://www.biogeodb.stri.si.edu); [www.frutosatrativosdocerrado.bio.br](http://www.frutosatrativosdocerrado.bio.br)

**Figura 3:** *Hymenaea martiana* Hayne.

As espécies *Hymenaea stignocarpa*, *Hymenaea courbaril* e *Hymenaea martiana* Hayne pertencem ao gênero *Hymenaea*, juntamente a outras 14 espécies. No Brasil, ocorrem 12 espécies com todas as variedades para elas reconhecidas, totalizando 23 táxons, sendo a maioria como nomes populares mais comuns Algarrobo, Guapinol, Jatobá, Jutaí, Locust, Jutaicí, Farinheira, Árvore-de-copal, dentre outros (LEE e LANGENHEIM, 1975; LEWIS et al., 2005).

Partes como resina, casca, raízes, polpa dos frutos e seiva são aproveitadas medicinalmente, sendo utilizadas contra afecções pulmonares de modo geral, dores e cólicas estomacais, como vermífugo e anti-diarreico, antifúngico, antioxidante, diurético, expectorante, hepatoprotetor, carminativo, adstringente, estimulante e energético (CORREA, 1984; LORENZI e MATOS, 2002).

Devido aos seus teores nutritivos, Silva et al. (2001) utilizaram a farinha do fruto de Jatobá na fabricação de “cookies”, e concluíram que a utilização de até 10% desta farinha, associada a farinha de trigo tradicional, proporciona um produto com alto teor de fibra alimentar e características sensoriais aceitáveis.

Em relação aos seus constituintes e seus efeitos, pode-se citar alguns estudos neste sentido. Barbosa et al. (2007) relataram que o extrato hidroacetônico de suas folhas após partição, fracionamento e análise cromatográfica, mostrou-se rico em flavonoides (canferol, quercetina, quercitrina e rutina). Ainda observaram que a fração orgânica apresentou, *in vitro*, atividade antifúngica para *Candida cladosporioides* e *Candida spherospermum* e atividade anticolinesterásica. De acordo com Lima (2007) a seiva do Jatobá apresenta as mesmas propriedades que o chá elaborado a partir da casca, sendo um fortalecedor do sistema imunológico.

Estudos fitoquímicos desenvolvidos por Nogueira et al. (2001) detectaram a presença de diterpenos na resina exsudada pelo tronco e em extratos da sua casca. Já em estudo realizado por

Abdel-Kader et al. (2002), observou-se a presença de três novos diterpenoides em extrato metanólico e a atividade citotóxica sobre células ovarianas cancerígenas. Pereira et al. (2007) analisaram cromatograficamente o óleo essencial extraído da resina de *H. courbaril*, o que possibilitou a identificação de 83,5% de sua composição química. Sendo observados os seguintes constituintes:  $\beta$ -cariofileno (60,5%), Óxido cariofileno (20,7%) e  $\alpha$ -Humuleno (2,3%). Neste mesmo estudo, o óleo essencial apresentou atividade antimicrobiana frente a *Salmonella thiphimurium*, *S. aureus*, *E. coli*, *Streptococcus haemolyticus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Novais et al. (2003), testando a atividade antimicrobiana de *H. stagnocarpa* Mart. ex Hayne, obtiveram bons resultados com cepas de *S. aureus*. De forma semelhante, Fernandes et al. (2005), obtiveram resultados positivos em relação ao extrato hidroalcoólico de *H. martiana* contra *Bacillus stearothermophilus* (ATCC 1262), *Micrococcus luteus* (ATCC 9341), *S. aureus* (ATCC 6538), *S. aureus* (ATCC 2722) e *S. aureus* (ATCC 10495).

Em outro estudo avaliando a sua atividade antimicrobiana, Peixoto (2009) observou bons resultados em relação às cepas de *S. aureus*, inclusive para a cepa MRSA. Semelhantemente, Sá et al. (2011) obtiveram bons resultados inibitórios em relação a cepas de *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Listeria* spp. e *Vibrio* spp. Recentemente, Silva et al. (2012), relataram que o extrato etanólico de *H. martiana* continha quantidade substancial de compostos fenólicos, que são também responsáveis pela sua atividade antioxidante, como flavonoides, além de terpenoides e esteroides.

Em relação à sua atividade antiaderente, pode-se citar estudo de Linhares e Ximenes (2011), que avaliando extrato de *Hymenaea stagnocarpa* Mart. Ex. Hayne frente a fatores de virulência de *S. aureus*, obtiveram boa redução na formação de biofilme.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Avaliar o efeito antimicrobiano e antiaderente *in vitro* de plantas da Caatinga frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp.

#### 3.2 Específicos

- Avaliar *in vitro* a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato etanólico de *Amburana cearensis* A. C. Smith (Amburana de cheiro) sobre cepas de *E. coli*, *Salmonella* spp. e *S. aureus* isoladas de amostras de leite e queijo provenientes de propriedades rurais do semiárido pernambucano e baiano;

- Avaliar *in vitro* a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato etanólico de *Hymenaea martiana* Hayne (Jatobá) sobre cepas de *E. coli*, *Salmonella* spp. e *S. aureus* isoladas de amostras de leite e queijo provenientes de propriedades rurais do semiárido pernambucano e baiano;

- Avaliar *in vitro* o efeito antiaderente do extrato etanólico de *H. martiana* Hayne, a partir da CBM obtida, sobre cepas de *S. aureus* isoladas de amostras de leite provenientes de propriedades rurais do semiárido pernambucano e baiano.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-KADER M. et al. Isolation and absolute configuration of ent-halimane diterpenoids from *Hymenaea courbaril* from the Suriname rain forest. **Journal of Natural Products**, v. 65, n.1, p. 11– 15, 2002.
- AKUTSU, R. C. et al. Adequação das boas práticas de fabricação em serviços de alimentação. **Revista de Nutrição**, v. 18, n. 3, p. 419-427, 2005.
- ALTEKRUSE, S. F. et al. Emerging Foodborne Diseases. **Emerging Infectious Diseases**, v. 3, n. 3, p. 285-293, 1997.
- AMMOR, M. S.; MICHAELIDIS, C.; NYCHAS, G. J. Insights into the role of quorum sensing in food spoilage. **Journal of food protection**, v. 71, n. 7, p. 1510-25, 2008.
- AYAR, A. et al. Effect of oregano and sage extracts on microbiological quality of molten butter. **Food Science and Technology Research**, v. 10, n. 2, p. 111-113, 2004.
- BAI, A. J.; RAI, V. R. Bacterial *Quorum Sensing* and food industry. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, n. 3, p. 183-193, 2011.
- BAJPAI, V. K. et al. Chemical composition and inhibitory parameters of essential oil and extracts of *Nandina domestica* Thunb. to control food-borne pathogenic and spoilage. **International Journal of Food Microbiology**, v.125, p.117-122, 2008.
- BARBOSA, M. P. C. et al. **Estudo químico e avaliação de atividade biológica de folhas de *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* (Heyne) Lee & Lang**. In: 30a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007.
- BENITES, A. T.; OLIVEIRA, V. R. O papel do consumidor na definição da qualidade de produtos agroalimentares. **Higiene Alimentar**, v.18, n. 125, p. 24-27, 2004.
- BERTELLI, D. et al. Effect of microwaves on volatile compounds in origanum. **Swiss Society of Food Science and Technology**, v. 36, p. 555-560, 2003.
- BLANCO, A. R. et al. Epigallocatechin gallate inhibits biofilm formation by ocular Staphylococcal isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 10, p. 4339–4343, 2005.
- BOARI, Cleube Andrade. **Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de cultivo**. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, MG, 2008. 80f.
- BORGES, M. F. et al. Perfil de contaminação por *Staphylococcus aureus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo coalho. **Ciência Rural**, 38, n.5, p. 1431-1438, 2008.

BOUABDELLI, F. et al. Antimicrobial activity of 22 plants used in urolithiasis medicine in Western Algeria. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 2, n. 1, p. 530-535, 2012.

BRAGA, R. Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará. 1976. In: ALMEIDA, J. R. G. S. et al. *Amburana cearensis* – uma revisão química e farmacológica. **Scientia Plena**, v. 6, n. 11, 2010.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Biodiversidade da caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação**. Brasília: Universidade Federal de Pernambuco. 2003. 382p.

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente. **Desmatamento na Caatinga já destruiu metade da vegetação original**. 2010. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/sitio/index.php?ido=ascom.noticiaMMA&codigo=5593>>. Acesso em: 02 jan. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Dados epidemiológicos - DTA período de 2000 a 2011**. 2011. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/10\\_passos\\_para\\_investigacao\\_surtos.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/10_passos_para_investigacao_surtos.pdf)>. Acesso em: 22 jan. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual integrado de prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos**. 2010. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual\\_dta.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_dta.pdf)> Acesso em: 13 out. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Resolução nº 12, de 02 de janeiro de 2001**. Dispõe sobre o Regulamento técnico dos padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, 03 jan. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Resolução nº 14, de 31 de março de 2010**. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial da União, Brasília, 29 mar. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999-2004**. Boletim eletrônico epidemiológico, Brasília, ano 5, n.6, 2005. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/bol\\_epi\\_6\\_2005\\_corrigido.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/bol_epi_6_2005_corrigido.pdf)> Acesso em: 13 out. 2012.

BRASIL. Secretaria Estadual de Saúde. **Resolução nº1757, de 18 de fevereiro de 2002**. Contraindica o uso de Plantas Medicinais no Âmbito do Estado do Rio de Janeiro e dá outras providências. Diário Oficial do Estado do Rio de Janeiro, 20 fev. 2002.

BRAVO, J. A. et al. Bioactive phenolic glycosides from *Amburana cearensis*. **Phytochemistry**, v. 50, p. 71-74, 1999.

BUCKEL, P. Toward a new natural medicine **Naturwissenschaften**, v. 85, n. 4, p. 155-63, 1998.

BURT, S. A. Essential Oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, n.3, 223-253, 2004.

BURT, S. A.; REINDERS, R. D. Antibacterial activity of select plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. **Letters in Applied Microbiology**, v. 36, p. 162-167, 2003.

CAIXETA, D. S. **Sanificantes químicos no controle de biofilmes formados por duas espécies de *Pseudomonas* em superfície de aço inoxidável.** Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, MG. 2008. 75p.

CAÑIGUERAL, S. et al. Plantas medicinales y fitoterapia: ¿Indicadores de dependencia o factores de desarrollo? **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 22, n.3, p. 265-278, 2003.

CANUTO, K. M.; SILVEIRA, E. R. Chemical constituents of trunk bark of *Amburana cearensis* A. C. Smith. **Química Nova**, v. 29, n.6, p. 1241-1243, 2006.

CAMPELO, P. M. S. Medicinal plants and its extracts: the necessity of continuous studies. Letter to the editor. **Estudos de Biologia**, v. 28, n. 62, 2006.

CAPASSO, R. Phytotherapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia**, v. 71, Suppl 1, p. S58-65, 2000.

CAPELLETTI, R. V. **Avaliação da atividade de biocidas em biofilmes formados a partir de fluido de corte utilizado na usinagem de metais.** Dissertação (Mestrado), Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 2006. 81p.

CASALINI, J. **Biofilmes microbianos na indústria de alimentos.** Trabalho Acadêmico (Bacharelado), Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul, RS, 2008. 46p.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, - CDC - **Surveillance for Foodborne-Disease Outbreaks - United States, 1998-2002. Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR) November, 2006.** Disponível em: <  
<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/ss5510a1.htm#top> > Acesso em: 13 out. 2012.

CERESER, N. D. et al. Avaliação da qualidade microbiológica da ricota comercializada em supermercados do estado de São Paulo. **Ciência Animal Brasileira**, v. 12, n. 1, p. 149-155, 2011.

CHAVES, L.C. D. **Estudo da cinética de formação de biofilmes em superfícies em contato com água potável.** Dissertação (Mestrado), Universidade do Minho, Lisboa. 2004. 156p.

CHENG, G. et al. Inhibition of bacterial adhesion and biofilm formation on zwitterionic surfaces. **Biomaterials**, v. 28, p. 4192- 4199, 2007.

CHRISTENSEN, A. B. et al. Quorum-sensing-directed protein expression in *Serratia proteamaculans* B5a. **Microbiology**, v. 149, p. 471-483, 2003.

CLARKE, J. H. R. et al. Um alerta sobre o uso de produtos de origem vegetal na gravidez. **Infarma**, v.19, n.1/2, p.41-48, 2007.

CORREA, P. M. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.** 1984. In: LEAL, L. K. A. M. et al. A comparative chemical and pharmacological study of standardized extracts and vanillic acid from wild and cultivated *Amburana cearensis* A. C. Smith. **Phytomedicine**, v. 18, p. 230–233, 2011.

CRAMTON, S. E.; et al. The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *S. aureus* and is required for biofilm formation. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 10, p. 5427-5433, 1999.

CROTEAU, R. et al. Natural products (Secondary Metabolites). 2000. In: FUMAGALI, E. et al. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 4, p. 627-641, 2008.

DE MEYER, N. et al. 4'-Hydroxy-3-methoxyflavones with potent antipicornavirus activity. **Journal of Medicinal Chemistre**, v. 34, p. 299-392, 1991.

DEON, B. C. **Diagnóstico de boas práticas de alimentação em domicílios da cidade de Santa Maria – RS.** (Dissertação) Mestrado, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS. 2012. 121p.

DINIZ, M. F. F. M. et al. **Memento Fitoterápico: As plantas como alternativa terapêutica: aspectos populares e científicos.** 1.ed. João Pessoa: Ed. Universitária, 1998. 202p.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.

DRENKARD, E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Review Microbes and Infections**, v. 5, n. 13, p. 1231-1219, 2003.

DUTCOSKY, S. D. **Análise sensorial de alimentos.** 3.ed. Curitiba: Champagnat, 2011. 426p.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Aplicação de antimicrobianos naturais na conservação de alimentos.** Documentos / Embrapa Agroindústria Tropical, 2011.

ENGELKE, F. Fitoterápicos e Legislação. **Jornal Brasileiro de Fitomedicina**, v. 1, p. 10-15, 2003.

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C. A. F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1.315-1.320, 2004.

FEITOSA, T. et al. Pesquisa de *Salmonella* spp., *Listeria* spp. e micro-organismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, p. 162-165, 2003.

FERNANDES, T. T. et al. Atividade antimicrobiana das plantas *Plathymenia reticulata*, *Hymenaea courbaril* e *Guazuma ulmifolia*. **Revista de Patologia Tropical**, v. 34, n. 2, p. 113-122, 2005.

FIGUEIREDO, V. F.; NETO, P. L. O. C. Implantação do HACCP na indústria de alimentos. **Gestão e Produção**, v.8, n.1, p.100-111, 2001.

FLACH, J. et al. Biofilmes formados em matéria-prima em contato com leite: fatores de virulência envolvidos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, n.3, p. 291-296, 2005.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. **Extratos Vegetais**. 2010. Disponível em: <<http://www.revista-fi.com/materias/120.pdf>> Acesso em: 13 abr. 2012.

FORSYTHE S. J. **Microbiology of safed food**. 2 ed. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2010.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 182p.

FRANCO, R. M. et al. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de leite e derivados. **Higiene Alimentar**, v.14, n.68, p.70-77, 2000.

FRATIANNI, F. et al. Preservation of Chicken Breast Meat Treated with Thyme and Balm Essential Oils. **Journal of Food Science**, v.75, n. 8, p. 528- 535, 2010.

FUMAGALI, E. et al. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 4, p. 627-641, 2008.

FUSTER-VALLS, N.; HERNA'NDES-HERRERO, M.; MARÍN-DE-MATEO, M.; RODRÍGUEZ-JEREZ, J. J. Effect of different environmental conditions on the bacteria survival on stainless steel surfaces. **Food Control**, v. 19, n. 3, p. 308-314, 2008.

GALLO, M.; KOREN, G. Can herbal products be used safely during pregnancy? Focus on Echinacea. **Canadian Family Physician**, v.47, p.1727-8, 2001.

GAVA, A. J; **Microbiologia de Alimentos. Princípios de Tecnologia de Alimentos**. São Paulo: Nobel, 2007. 284p.

GERMANO, P. M. L; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 4 ed. São Paulo: Manole, 2011. 1034p.

GIOVA, A. T. **APPCC na qualidade e segurança microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997. 377p.

GOTTLIEB, O. New and underutilized plants in the Americas: Solution to problems of inventory through systematics. **Interciência**, v. 6, n. 1, p. 22-29, 1981.

GREIG, J. D.; RAVEL, A. Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution. **International Journal of Food Microbiology**, v. 130, p.77-87, 2009.

HAUN, M. A. D. **Avaliação da eficiência de um esterilizador a plasma na inativação de *Pseudomonas fluorescens***. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, SP, 2004. 71f.

HAVELAAR, A. H. et al. Future challenges to microbial food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139 p.79-94, 1994.

HERRERA, J. J. R. et al. Adhesion and detachment kinetics of several strains of *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* under three different experimental conditions. **Food Microbiology**, v. 24, n. 6, p. 585-591, 2007.

HOULT, J. R.; PAYÁ, M. Pharmacological and Biochemical Actions of Simple Coumarins: Natural Products with Therapeutic Potential. **General Pharmacology**, v. 27, n. 4, p. 713-722, 1996.

HOUNA, A. B. et al. Chemical composition, cytotoxicity effect and antimicrobial activity of *Ceratonia siliqua* essential oil with preservative effects against *Listeria* inoculated in minced beef meat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 148, p. 66–72, 2011.

HUGHES, C. et al. Foodborne transmission of infectious intestinal disease in England and Wales, 1992–2003. **Food Control**, v. 18, n. 7, p.766–772, 2007.

ICMSF. International Committee on Microbiological Specification for Food. **Microrganismos de los alimentos: su significado y metodos de enumeracion**. Zaragoza: Acribia, 2000. 439p.

JACOBSON, T. K. B. et al. Influência de fatores edáficos na produção de fenóis totais e taninos de duas espécies de barbatimão. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 35, n. 3, p. 163-9, 2005.

KUMAR, R.; SINGH, M. Tannins: their adverse role in ruminant nutrition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 32, n.3, p. 447-453, 1984.

LEAL, L.K.A.M. et al. Mechanisms underlying the relaxation induced by isokaempferide from *Amburana cearensis* in the guinea-pig isolated trachea. **Life Sciences**, v.79, p. 98-104, 2006.

LEAL, L. K. A. M.; et al. Toxicological study of the hydroalcoholic extract from *Amburana cearensis* in rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 41, p. 308-314, 2003.

LEE, Y-T.; LANGENHEIM, J.H. Systematics of the genus *Hymenaea* L. (Leguminosae, Caesalpinioideae, Detarieae). **University of California Publications in Botany**, v.69, p.1-109, 1975.

LEONCIO, C. S.; BARTOLOZO, E. Q. Programas de qualidade em unidades de alimentação e nutrição. **Higiene Alimentar**, v. 17, n.104/105, p.96, 2003.

LEVINGER, B. School feeding, school reform, and food security: connecting the dots. **Food Nutrition Bulletin**, v.26, p.170-178, 2005.

LEWIS G. et al. Legumes of the World. 2005. In: PESTANA, L. T. **Estudo taxonômico de *Hymenaea* L.: complexo *H. courbaril*, *H. martiana* e *H. stigonocarpa* (Fabaceae: Caesalpinioideae: Detarieae)**. Dissertação (Mestrado) – Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS. 2010. 56p. Disponível em: <http://pt.scribd.com/doc/32130951/PESTANA-2010-Estudo-taxonomico-de-Hymenaea-L-complexo-H-courbaril-H-martiana-e-H-stigonocarpa-Fabaceae-Caesalpinioideae-Detarieae>>. Acesso em: 27 out. 2012.

LI, J. et al. Arabidopsis mutants are hypersensitive to UV-B radiation. **The Plant Cell**, v. 5, n. 2, p. 171-179, 1993.

LIMA, A. F. **Manejo da seiva do jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) por famílias tradicionais na reserva extrativista Chico Mendes, Acre –Brasil**. In: Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil, 23 a 28 de Setembro de 2007, Caxambu – MG. 2007.

LINHARES, L. A.; XIMENES, E. C. P. A. Efeito da concentração subinibitória do extrato de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. Ex. Hayne sobre os fatores de Virulência de *staphylococcus aureus*. In: XIX CONIC, III CONITI, VII JOIC, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Recife, PE. 2011.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. 2002. In: SILVA, T. C. L. et al. Atividades antioxidante e antimicrobiana de *Ziziphus joazeiro* mart. (Rhamnaceae): avaliação comparativa entre cascas e folhas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 2, p. 193-199, 2011.

LOWY, F. D. *Staphylococcus aureus* infections. **New England Journal of Medicine**, v.339, n. 8, p.520-532, 1998.

LUCCHESI, E. G. **Desenvolvimento de sistema de obtenção de biofilmes *in vitro* e avaliação de sua susceptibilidade a biocidas**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, SP, 2006. 77f.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: a necessidades de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 23, n. 3, p. 429-438, 2002.

MARCOLAN, M. et al. **Influência do solvente no sinal de fluorescência da 7-hidroxicumarina**. In: XII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e VIII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba. São José dos Campos, São Paulo. 2008.

MELO, J. G. et al. Qualidade de produtos à base de plantas medicinais comercializados no Brasil: castanha-da-índia (*Aesculus hippocastanum* L.), capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf ) e centela (*Centella asiatica* (L.) Urban). **Acta Botânica Brasileira**, v. 21, n. 1, p. 27-36, 2007.

MING, L. C. et al. Espécies Brasileiras com potencial alimentar: uso atual e desafios. 2000. In: SILVA, C. G. **Estudo etnobotânico e da atividade antimicrobiana ‘in vitro’ de plantas medicinais na comunidade do Sítio Nazaré, município de Milagres, Ceará**. Dissertação (Mestrado), Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Patos, PB. 2012. 93p.

MONTEBELLO, N. P.; ARAÚJO, W. M. C. **Carne e Cia**. Brasília: SENAC, 2006. In: LANGE, T. N. **Avaliação do laudo de inspeção como instrumento de verificação das condições higiênico-sanitárias de estabelecimentos varejistas de carnes do município de Ribeirão Pires- SP**. Dissertação (Mestrado), Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, São Paulo, SP. 2010.

MORAES, J. E. **Estudo da corrosão microbiológica no aço inoxidável 316 em  $Na_2SO_4$  0,5 mol l<sup>-1</sup>**. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual do Centro-Oeste, UNICENTRO, Guarapuava, PR, 2009. 96p.

MUCH, P. et al. Foodborne infectious outbreaks, Austria 2005. **Wiener Klinische Wochenschrift**, v. 119, n. 5-6, p.150–157, 2007.

MÜRMAN L. et al. Quantification and molecular characterization of *Salmonella* isolated from food samples involved in salmonellosis outbreaks in Rio Grande do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p.529-534, 2008.

NAKAMURA, Y. et al. Method for analysis of tannic acid and its matabolites in biological samples: Application to tannic acid metabolism in the rat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 1, p. 331-339, 2003.

NETO, P. A. S. P.; CAETANO, L. C. **Plantas medicinais: do popular ao científico**. Maceió: EDUFAL, 2005. 90p.

NOGUEIRA, R. T. et al. Clerodane-type diterpenes from the seed pods of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*. **Phytochemistry**, v. 58, n. 8, p. 1153-1157, 2001.

NOVAIS, T. S. et al. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semiárido brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognósia**, v. 13 supl 2, p. 05-08, 2003.

NOVELY, P. E. **Aspectos do efeito do superpastoreio na produção e manejo de pastagem nativa no Nordeste do Brasil**. In: SANTANA, D. F. Y. et al. Caracterização da Caatinga e da dieta de novilhos fistulados, na época chuvosa, no semiárido de Pernambuco. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, n.1, p.69-78, 2011.

OLIVEIRA, A. B. A. et al. Doenças transmitidas por alimentos, principais agentes etiológicos e aspectos gerais: uma revisão. **Revista do Hospital das Clínicas de Porto Alegre**, v. 30, n. 3, p. 279-285, 2010.

OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18, n. 2, p. 301-307, 2008.

O'TOOLE, G. et al. Biofilm formation as microbial development. **Annual Review Microbiology**, v. 54, p. 49-79, 2000.

OULAHAL, N. et al. Quantitative analysis of survival of *Staphylococcus aureus* or *Listeria innocua* on two types of surfaces: polypropylene and stainless steel in contact with three different dairy products. **Food control**, v. 19, p. 178-185, 2008.

PEIXOTO, R. M. **Mastite em pequenos ruminantes: etiologia, fatores de risco, diagnóstico e sensibilidade aos agentes antimicrobianos e extratos de plantas**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, Petrolina, PE. 2009. 129p.

PEREIRA, B. M. R. et al. Abordagem farmacológica de plantas recomendadas pela medicina folclórica como antiofídicas III. Atividade antidermatogênica. 1992. In: MARCOLAN, M. et al. **Influência do solvente no sinal de fluorescência da 7-hidroxicumarina**. In: XII Encontro

Latino Americano de Iniciação Científica e VIII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba. São José dos Campos, São Paulo. 2008.

PEREIRA, C. K. B. et al. **Composição química, atividade antimicrobiana e toxicidade do óleo essencial de *Hymenaea courbaril* (jatobá)**. In: 30<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007.

PEREIRA, M. C. et al. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 4, p. 731-738, 2006.

PEREIRA, O. B. O. **Comparação da eficácia de dois biocidas (carbamato e glutaraldeído) em sistemas de biofilme**. Tese (Doutorado), Universidade do Minho, Braga. 2001. 211p.

PERES, L. E. P. **Metabolismo secundário**. São Paulo: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2004.

RODRIGUES, R. F. **Extração de cumarina a partir das sementes amburana (*Torresea cearensis*) utilizando dióxido de carbono supercrítico**. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas, SP. 2005. 115p.

RUMJANEK, N. G.; FONSECA, M. C. C. XAVIER, G. R. Quorum sensing em sistemas agrícolas. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 33, 2004.

SÁ, M. C. A. et al. Antimicrobial activity of Caatinga biome ethanolic plant extracts against gram negative and positive bacteria. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 18, n. 2/3, p. 62-66, 2011.

SAEIDNIA, S. et al. Bioactive constituents from *Dracocephalum subcapitatum* (O. Kuntze) Lipsky. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 60, p. 22-24, 2005.

SAIDENBERG, A. B. S. **Deteção de fatores de virulência de *Escherichia coli* isoladas de psitacídeos com diferentes manifestações clínicas**. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ, São Paulo, SP. 2008. 76p.

SALVARO, L. M. S. **Reguladores vegetais e poliaminas na organogênese *in vitro* de *Piper hispidinervium* Candolle de Candolle: análises biométricas e bioquímicas**. Tese (Doutorado), Universidade Estadual Paulista-UNESP, Botucatu, SP. 2009. 118p.

SANTOS, D. Y. A. C. et al. Curso para atualização de professores de **Educação Básica: A Botânica no cotidiano**. São Paulo: Universidade de São Paulo, Fundo de Cultura e Extensão: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Botânica. Projeto de Cultura e Extensão Ensino de Botânica. 2008. 124p.

SCHAUDER, S.; BASSLER, B. L. The languages of bacteria. **Genes & development, Cold Spring Harbor**, v.15, n. 12, p.1468-1480, 2001.

SCHENKEL, E. P. et al. Saponinas. 2001. In: CASTEJON, F. V. **Taninos e Saponinas**. Disciplina seminários aplicados, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Universidade Federal de Goiás, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia -EMZV, Goiânia, GO, 2011. 26p.

SHAN, B. et al. Potential application of spice and herb extracts as natural preservatives in cheese. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 3, p. 284–290, 2011.

SILVA, A. C. O.; ALBUQUERQUE, U. P. Woody medicinal plants of the Caatinga in the state of Pernambuco (Northeast Brazil). **Acta Botânica Brasílica**, v.19, p. 17-26, 2005.

SILVA, J. G. et al. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 4, p. 572-577, 2007.

SILVA, M. E. G. C. et al. HPLC-DAD analysis and antioxidant activity of *Hymenaea martiana* Hayne (Fabaceae). **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 4, n. 2, p. 1160-1166, 2012.

SILVA, M. I. G. et al. Bioactivity and potential therapeutic benefits of some medicinal plants from the Caatinga (semi-arid) vegetation of Northeast Brazil: a review of the literature. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n.1, p. 193-207, 2012.

SILVA, M. R. et al. Utilização tecnológica dos frutos de Jatobá-do-cerrado e de Jatobá-da-mata na elaboração de biscoitos fontes de fibra alimentar e isentos de açúcares. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 2, p. 176-182, 2001.

SIMÕES, C. M. O. et. al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2001. In: SILVA, N. L. A. et al. Triagem Fitoquímica de Plantas de Cerrado, da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. **Scientia Plena**, v. 6, n. 2, p. 1-17, 2010.

SIVROUPOULOU, A. et al. Antimicrobial activity of mint essential oils. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 9, p. 2384-2388, 1995.

SOUZA, M. R. P. **Higienização de equipamentos de ordenha mecanizada canalizada: diagnóstico de procedimentos tecnológicos**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ. 2005. 66p.

SOUZA, V. A. de. Surto de doenças transmitidas por alimentos envolvendo manipuladores de alimentos. **Higiene Alimentar**, v. 24, n. 182, p. 40-46, 2010.

SMITH, J. L. et al. *Quorum sensing*: A primer for food microbiologists. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 5, p. 1053-1070, 2004.

SMITH, R. S.; IGLEWSKI, B. H. *Pseudomonas aeruginosa* *Quorum-sensing* systems and virulence. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 56-60, 2003.

STOODLEY, P.; et al. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 56, p. 187-209, 2002.

STRYCHARZ, S.; SHETTY, K. Response of oregano (*Origanum vulgare* L.) clonal lines to *Pseudomonas* sp. Z strain and polyde R-478 and implications for hyperhydricity prevention in tissue culture. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 343-350, 2002.

SUTHERLAND, I. W. The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. **Trends in Microbiology**, n.5, v.9, p. 222-227, 2001.

TAUXE, R.V.et al. Evolving public health approaches to the global challenge of foodborne infection. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, p.16-28, 2010.

TORRES, S. A. M. **Locais de preparação e comércio de cachorro-quente: avaliação higiênico-sanitária e o ponto de vista do consumidor**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, MG. 2008. 79p.

TURINA, A. V. et al. Natural terpenes: selfassembly and membrane partitioning. **Biophysical Chemistry**, v. 122, p.101-113, 2006.

VAILLANT, V. et al. Foodborne Infections in France. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 2, p. 221-32. 2005.

VALENTE, D.; PASSOS, A. D. C. Avaliação higiênico-sanitária e físico-estrutural dos supermercados de uma cidade do Sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 7, n. 1, p. 80-87. 2004.

VEIGA JÚNIOR, V. F. et al. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n.3, p.519- 28, 2005.

VIANA, E. S. **Moléculas sinalizadoras de *Quorum sensing* em biofilmes formados por bactérias psicrotóficas isoladas de leite**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, MG. 2006. 176p.

VON POSER, G. L.; MENTZ, L. A. Diversidade biológica e sistemas de classificação. 5ed. In: NETO, P. A. S. P.; CAETANO, L. C. **Plantas medicinais: do popular ao científico**. Maceió: EDUFAL, 2005. 90p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). **Food hygiene (basic text)**. Rome, 2009. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/012/a1552e/a1552e00.htm>>. Acesso em: 22 jan. 2013.

ZOTOLLA, E. A.; SASAHARA, K. C. Microbial attachment and biofilm formation: A new problem for the food industry? **Food Technology**, v. 48, p. 107-114, 1994.

## **ARTIGO**

### **Efeito antimicrobiano *in vitro* de plantas do bioma Caatinga frente a micro-organismos patogênicos de origem alimentar**

**(Encaminhado para o periódico “Ciência Rural”)**

## Efeito antimicrobiano *in vitro* de plantas do bioma Caatinga frente a micro-organismos patogênicos de origem alimentar

### Antimicrobial effect *in vitro* of plants from Caatinga biome against foodborn pathogens

#### RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito antimicrobiano *in vitro* do extrato etanólico de *Hymenaea martiana* Hayne e de *Amburana cearensis* A. C. Smith frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. isolados de leite e queijo do semiárido pernambucano e baiano. Foram utilizadas 84 amostras, sendo 30 de *E. coli*, 30 de *S. aureus* e 24 de *Salmonella* spp., incluindo as cepas ATCC 35218 (*E. coli*), ATCC 25923 (*S. aureus*) e ATCC 14023 (*Salmonella* spp.). Na determinação da concentração bactericida mínima, utilizou-se placas de microtitulação contendo caldo Mueller-Hinton e após incubação do material, com a utilização de um replicador, alíquotas foram semeadas em placas de petri contendo ágar Mueller-Hinton, seguindo-se de nova incubação. Observou-se que *A. cearensis* inibiu 80% das cepas de *S. aureus*, 4,2% das cepas de *Salmonella* spp., mas não apresentou efeito nas de *E. coli*. *H. martiana* inibiu 100% das cepas de *S. aureus*, 33% das de *Salmonella* spp. e também não apresentou efeito nas de *E. coli*. Diante disso, sugere-se que os antimicrobianos naturais podem oferecer vantagens para a área de alimentos, favorecendo a qualidade higiênico-sanitária e a vida útil dos produtos.

**Palavras-chave:** Doenças transmitidas por alimentos. Leite. Produtos naturais. Queijo.

#### ABSTRACT

This study aimed to evaluate the antimicrobial effect *in vitro* of ethanolic extract of *Hymenaea martiana* Hayne and of *Amburana cearensis* A. C. Smith against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. isolated from samples of milk and cheese from the

semiarid region of Pernambuco and Bahia. Were used 84 samples, 30 *E. coli*, 30 *S. aureus* and 24 *Salmonella spp.*, including strains ATCC 35218 (*E. coli*), ATCC 25923 (*S. aureus*) and ATCC 14023 (*Salmonella spp.*). In the determination of minimum bactericidal concentration, was used microtiter plates containing Mueller-Hinton broth and after incubation of the material with the use of a replicator, aliquots were sown on petri dishes containing Mueller-Hinton agar, followed by a further incubation. It was observed that *A. cearensis* inhibited 80% of the strains *S. aureus*, 4,2% of *Salmonella spp.*, but had no effect in strains of *E. coli*. *H. martiana* inhibited 100% of the strains of *S. aureus*, 33% of *Salmonella spp.* and also had no effect on *E. coli*. Therefore, it is suggested that the natural antimicrobial may offer advantages for the food area, favoring the sanitary quality and shelf life of products.

**Key words:** Cheese. Foodborne diseases. Milk. Natural products.

## INTRODUÇÃO

A ingestão de alimentos contaminados pode colocar em risco a saúde da população, já que micro-organismos podem desencadear doenças transmitidas por alimentos (DTA), além de provocar a diminuição do tempo de prateleira dos produtos (TAUXE et al., 2010). De acordo com o Ministério da Saúde (BRASIL, 2011), *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* estão entre os agentes bacterianos mais frequentemente envolvidos em surtos provenientes de alimentos contaminados.

A demanda de comercialização de alimentos seguros tem despertado o interesse na utilização de produtos naturais que possam ser aplicados sozinhos ou combinados com outra tecnologia de controle e inibição de micro-organismos, garantindo também o seu valor nutricional. Neste sentido, os compostos de natureza vegetal apresentam um potencial relevante na inibição de micro-organismos, revelando uma nova perspectiva de emprego para estes elementos. Além dos benefícios proporcionados à saúde, e de serem um atrativo ao consumidor,

estudos têm demonstrado o efeito inibidor de extratos vegetais em relação a micro-organismos (PEREIRA et al., 2006; ALBUQUERQUE et al., 2007).

Várias espécies vegetais dos biomas brasileiros têm sido objeto de estudo, sendo o bioma Caatinga o mais importante tipo de vegetação do semiárido do Nordeste brasileiro, possuindo um patrimônio biológico muito diversificado. Dentre as espécies estudadas, estão a *Hymenaea martiana* Hayne e a *Amburana cearensis* A. C. Smith, ambas conhecidas popularmente e utilizadas na região semiárida pernambucana e baiana (BRASIL, 2003). O Jatobá (*Hymenaea martiana* Hayne), na medicina popular é utilizado no tratamento de problemas respiratórios e gastrointestinais, sendo relacionado também a ações anti-séptica, depurativa, antibacteriana, antioxidante e anti-inflamatória (LORENZI & MATOS, 2002; PEREIRA et al., 2007). A Amburana (*Amburana cearensis* A. C. Smith) é tradicionalmente utilizada como antiespasmódico, anti-inflamatório, antitússico e no tratamento de asma (CORREA & PENNA, 1984; SILVA et al., 2007).

Diante do exposto, objetivou-se avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato etanólico de *Hymenaea martiana* Hayne e de *Amburana cearensis* A. C. Smith, frente a *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus*.

## MATERIAL E MÉTODOS

O material vegetal foi coletado em Petrolina, Pernambuco, Brasil e identificado por um botânico responsável, sendo as exsiccatas codificadas e depositadas no Herbário da Universidade Federal do Vale do São Francisco (HVASF). Seguiu-se com a dessecação durante três dias em estufa com circulação forçada à temperatura média de 40°C e o processamento em moinho, para obter um material vegetal seco e pulverizado submetido à maceração exaustiva com etanol 95% em um recipiente de aço inoxidável. Após várias extrações, com intervalos de 72 horas, obteve-

se o completo esgotamento do material vegetal. A solução extrativa passou então pela destilação do solvente, obtendo-se o extrato etanólico bruto (EEB).

Foram utilizados 84 isolados, sendo 30 de *Escherichia coli*, 30 de *Staphylococcus aureus* e 24 de *Salmonella spp.*, obtidos de amostras de queijo e leite provenientes de rebanhos bovinos de propriedades rurais dos municípios de Petrolina e região (Afrânio, Santa Maria da Boa Vista-PE e Senhor do Bonfim-BA), incluindo as cepas de referência ATCC 35218 (*E. coli*), ATCC 25923 (*S. aureus*) e ATCC 14023 (*Salmonella spp.*).

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF). De cada EEB, 0,25g foram diluídos em 10mL de água destilada estéril, obtendo-se a solução estoque de cada um na concentração de 25mg/mL. Na preparação do inóculo, colônias obtidas em ágar Mueller-Hinton foram utilizadas no preparo da suspensão bacteriana em solução salina 0,085% com turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de MacFarland. Desta suspensão foram inoculados 100µL em tubos contendo 9,9 mL de caldo Mueller-Hinton.

Para determinação da concentração bactericida mínima (CBM), 200µL de caldo Mueller-Hinton foram distribuídos em placas de microtitulação de 96 poços; a seguir, 200 µL da solução estoque de extrato foram acrescentados ao primeiro poço e, após homogeneização, transferidos para o segundo e assim sucessivamente, sendo obtidas as seguintes concentrações finais: 12.500; 6.250; 3.125; 1.562,5; 781,2; 390,6; 195,3 e 97,6µg/mL. Em seguida, 10µL da suspensão bacteriana foram inseridos nos poços das microplacas contendo a diluição do extrato, sendo o material incubado a 37°C por 24h.

Com a utilização de um replicador, alíquotas foram retiradas das microplacas após a incubação e semeadas em placas de petri contendo ágar Mueller-Hinton, seguindo-se de incubação por 48h a 37°C. Definiu-se a CBM como a menor concentração do extrato etanólico capaz de causar a morte do inóculo (CLSI, 2006).

Devido à coloração dos extratos, que dificulta a visualização de turvação na microplaca, não foi possível visualizar a concentração inibitória mínima (CIM), sendo por isso, considerados os resultados da concentração bactericida mínima (CBM).

## RESULTADOS

Maior inibição dos micro-organismos foi obtida pelo extrato de *H. martiana*, representada por 45,2% (n= 38/84), contra 29,8% (n= 25/84) de inibição apresentada por *A. cearensis*. Os dois extratos testados apresentaram atividade inibitória nas cepas de *S. aureus* e *Salmonella spp.*, onde *A. cearensis* inibiu 80% (n= 24/30) das cepas de *S. aureus*, e 4,2% (n= 1/24) das cepas de *Salmonella spp.* Já *H. martiana* inibiu 100% (n= 30/30) das cepas de *S. aureus* e 33% (n= 8/24) das de *Salmonella spp.* Porém, no que diz respeito à *E. coli*, 100% (n= 30/30) das cepas mostraram-se resistentes aos dois extratos. Observou-se que apenas a cepa ATCC de *S. aureus* foi inibida, e pelo extrato de *H. martiana* na concentração de 1.562,5µg/mL. A susceptibilidade dos isolados, com a porcentagem de atividade, a faixa e a média de inibição apresentadas pelos extratos testados, encontra-se abaixo (Tabela 1).

Observou-se que a média da CBM apresentada pelo extrato etanólico de *A. cearensis* em relação a *S. aureus* foi de 142.13µg/mL, enquanto que o extrato etanólico de *H. martiana* apresentou média de 788.53µg/mL. Houve inibição dos isolados de *Staphylococcus* pelos dois extratos, com a mesma faixa de inibição, sendo a variação de 12.500 a 195,3µg/mL. Em relação aos isolados de *Salmonella spp.*, a média de CBM apresentada pelo extrato de *A. cearensis* foi de 0,52µg/mL, não havendo variação de inibição, que ocorreu sempre na concentração de 12.500µg/mL. Já no extrato de *H. martiana*, a média da CBM foi de 3,90µg/mL, havendo variação de inibição numa faixa de 12.500 a 6.250µg/mL.

**Tabela 1:** Susceptibilidade *in vitro* de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.* e *Escherichia coli* isolados de amostras de leite e queijo provenientes do semiárido pernambucano

e baiano frente aos extratos etanólicos de *Amburana cearensis* A. C. Smith e *Hymenaea martiana* Hayne.

Micro-organismo	Espécie/ Extrato	Atividade observada (%)	Concentração Bactericida Mínima ( $\mu\text{g/mL}$ )	
			Faixa	Média
<i>S. aureus</i>	<i>A. cearensis</i>	80	12.500 - 195,3	142.13
<i>Salmonella</i> spp.		4,2	12.500	0,52
<i>E. coli</i>		--	--	--
<i>S. aureus</i>	<i>H. martiana</i>	100	12.500 - 195,3	788.53
<i>Salmonella</i> spp.		33	12.500 - 6.250	3,9
<i>E. coli</i>		--	--	--

Levando-se em consideração as concentrações testadas frente às cepas de *S. aureus*, observou-se que a *A. cearensis* apresentou melhor resultado na concentração de 12.500 $\mu\text{g/mL}$ , já em relação a *H. martiana*, melhores resultados foram obtidos em 1.562,5 $\mu\text{g/mL}$ .

## DISCUSSÃO

Observou-se que *H. martiana* apresentou atividade antimicrobiana mesmo em baixas concentrações, sugerindo uma melhor atividade em relação à *A. cearensis* nos testes *in vitro*. Além disso, observou-se um melhor resultado em relação aos isolados Gram-positivos (*S. aureus*) em comparação aos Gram-negativos (*E. coli* e *Salmonella* spp.), o que pode ser comprovado pelo fato de *A. cearensis* ter inibido apenas um dos 24 isolados de *Salmonella* spp. testados, na concentração de 12.500 $\mu\text{g/mL}$  e de *H. martiana* apresentar inibição em oito isolados e na faixa de 12.500 a 6.250 $\mu\text{g/mL}$ . Já em relação à faixa de inibição observada em *S. aureus*, nos dois extratos, houve uma grande variação, onde *A. cearensis* e *H. martiana* inibiram de 12.500 a 195,3 $\mu\text{g/mL}$ .

Esta resistência pode estar associada à presença de uma barreira de permeabilidade na membrana exterior de bactérias Gram-negativas, que limita o acesso dos agentes antimicrobianos, sendo estas tipicamente mais resistentes a agentes antimicrobianos do que as Gram-positivas (QUINN et al., 2005).

Estudos têm demonstrado a presença de atividade antibacteriana *in vitro* em plantas do gênero *Hymenaea* e de acordo com VALENTIM et al. (2006), a *H. courbaril* é a espécie mais estudada. Relata-se a presença de diterpenos na resina exsudada pelo tronco e em extratos da casca de espécies de *Hymenaea*, incluindo *H. courbaril*, a partir de estudos fitoquímicos. Já em relação às folhas, relata-se que o extrato hidroacetônico mostrou-se rico em flavonoides, um composto fenólico. Foi identificado também o flavonoide Astilbina em extrato bruto da casca de *H. martiana*. No caso de *A. cearensis*, a presença de cumarina, flavonoides e taninos está relacionada aos seus efeitos, sendo o dicumarol, responsável por sua ação antibacteriana (CARNEIRO, 1993; NOGUEIRA et al., 2001; BARBOSA et al., 2007; MELO, 2007). Recentemente, estudo desenvolvido por SILVA et al. (2012), mostrou que extrato etanólico de *H. martiana* continha quantidade substancial de compostos fenólicos, que são também responsáveis pela sua atividade antioxidante, como flavonoides, além de terpenoides e esteroides. Importante citar que alguns tipos de chalconas, uma sub-classe dos flavonoides, apresentam atividade bacteriostática ativa contra *S. aureus* (CROTEAU et al., 2000; SANTOS et al., 2008). Além disso, testes de toxicidade com *A. cearensis* revelaram baixa toxicidade quando administrada por via oral, contudo o mesmo não foi observado para administração via intraperitoneal (LEAL et al., 2003). PEREIRA et al. (2007) avaliaram a toxicidade do óleo essencial de *H. courbaril*, e obtiveram valores inferiores ( $CL_{50}$  de 8,83 $\mu$ g/mL) ao limite estabelecido (1.000 $\mu$ g/mL).

Os componentes fenólicos são citados como os principais responsáveis pelas propriedades antibacterianas de plantas, porém há relatos de que compostos não fenólicos, como o alil-isotiocianato, são mais efetivos contra bactérias Gram-negativas, além de também serem efetivos contra fungos (TURINA et al., 2006).

Todavia, o teor de compostos bioativos nas plantas está relacionado ao seu crescimento no ambiente, à técnica da sua colheita, o ciclo vegetativo, as partes escolhidas, as condições de solo

e a sazonalidade. Além disso, os diferentes padrões de resistência apresentados pelas cepas dos micro-organismos, a origem da cepa e as características inerentes ao gênero em questão, assim como as diferenças nas técnicas empregadas para investigação da ação dos compostos e a composição química de algumas preparações vegetais podem resultar em dados de difícil comparação entre as pesquisas (SIVROUPOULOU et al., 1995; OSTROSKY et al., 2008; BOUADBELLI et al., 2012). Assim, estes fatores podem justificar a variação de resultados encontrados em trabalhos similares.

A este respeito, PEIXOTO (2009), avaliando extratos etanólicos frente a *S. aureus* obtidos de casos de mastite subclínica, observou que para a cepa Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *H. martiana* apresentou CBM de 10.417µg/mL, e em relação aos demais isolados de *S. aureus*, também apresentou atividade antimicrobiana, com inibição em 99,4% das amostras. Em relação à *A. cearensis*, observou CBM de 12.500µg/mL frente à cepa MRSA e inibição de 88,1% frente aos demais isolados de *S. aureus*. Percebe-se que estes valores se aproximam dos obtidos no presente estudo, em que a inibição de *S. aureus* por parte de *H. martiana* foi de 100% e por parte de *A. cearensis* foi de 80%.

Já SÁ et al. (2011), em estudo semelhante, avaliando extrato de *Hymenaea courbaril* e *A. cearensis*, obtiveram inibição de *E. coli*, *Salmonella spp.* e *S. aureus*, além de *Yersinia enterocolitica*, *Listeria spp.* e *Vibrio spp.*, onde as médias para *H. courbaril* foram: *E. coli* (104.2µg/mL), *Salmonella spp.* (145.8µg/mL) e *S. aureus* (104.2µg/mL), e para *A. cearensis*: *E. coli* (166.7µg/mL); *Salmonella spp.* (145.8µg/mL) e *S. aureus* (145.8µg/mL). As divergências entre os resultados encontrados em relação aos do presente estudo podem ser explicadas por diferenças no teor de compostos bioativos e no manuseio das espécies vegetais, assim como por fatores relacionados às cepas utilizadas. Em relação a isso, ressalta-se que a diversidade de pontos onde as amostras de leite e queijo foram coletadas pode influenciar no comportamento das cepas em relação à atuação dos extratos.

BRAVO et al. (1999) relatam atividade biológica de *A. cearensis* contra *Shigella flexneri* e *E. coli*, ao contrário do presente estudo. Neste contexto, GONÇALVES et al. (2005), avaliando o potencial antimicrobiano do extrato hidroalcolico da *Hymenaea courbaril* utilizando o método da difusão em ágar, frente a bactérias Gram-positivas e negativas provenientes de infecções clínicas em humanos, observaram inibição de *S. aureus* e *Proteus mirabilis*. Resultados semelhantes foram relatados por GRANATO et al. (2005), quando avaliaram a atividade antimicrobiana do extrato metanólico, obtido do rejeito resultante do beneficiamento da madeira, sendo encontrada atividade contra *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *Micrococcus luteus* e *S. aureus*.

Contudo, corroborando com os resultados obtidos neste estudo em relação às cepas de *E. coli*, NOVAIS et al. (2003), testando a atividade antimicrobiana de *Hymenaea stignocarpa* Mart. ex Hayne contra *S. aureus* e *E.coli* com um extrato clorofórmico, obtiveram como resultado um halo de inibição de 8mm para *S. aureus*, mas não observaram inibição para *E. coli*. Além disto, ressalta-se que dentre os 137 extratos de espécies de vegetais avaliados pelo estudo citado acima, sete demonstraram atividade antibacteriana contra *S. aureus* e nenhum dos extratos foi ativo contra *E. coli*. Resultado similar foi obtido por FERNANDES et al. (2005) ao avaliar o extrato hidroalcolico de *H. courbaril*, onde relataram inibição de 63,3% das espécies bacterianas Gram-positivas e não inibição das Gram-negativas. Em estudo recente, MARTINS et al. (2013) avaliando extrato bruto metanólico de folhas de *Larrea tridentata* (Arbusto de Creosoto), observaram bons resultados frente a bactérias Gram-positivas e nenhum resultado frente às Gram-negativas. O que pode demonstrar a resistência de Gram-negativas também em relação a extratos de outra espécies vegetais.

Mesmo sendo necessário se reportar a estudos semelhantes para respaldar os resultados encontrados, quando se avalia a atividade antimicrobiana de produtos naturais não há um consenso em relação à concentração ideal para inibição (DUARTE, 2007). Em relação a isto,

ALIGIANIS et al. (2001) propuseram uma classificação para extratos vegetais com base nos resultados de CIM e CBM. Considerando assim, como forte inibição - CBM até 500µg/mL; inibição moderada – CBM entre 600 e 1.500 µg/mL e como fraca inibição - CBM acima de 1.600 µg/mL. Porém, de acordo com PEIXOTO (2009), trata-se de um método subjetivo, pois não leva em consideração uma série de fatores que podem interferir no resultado da CBM, como a variabilidade e a disponibilidade dos compostos bioativos presentes, responsáveis pela atividade antimicrobiana dos extratos vegetais.

Cada vez mais percebe-se uma maior procura por produtos antimicrobianos e antioxidantes naturais para uso em cosméticos, produtos farmacêuticos e alimentos, com o intuito de evitar produtos sintéticos (SILVA et al., 2012). Neste contexto pode-se citar, por exemplo, a utilização de farinha do fruto de Jatobá por SILVA et al. (2001) na fabricação de “cookies”, onde concluíram que a utilização de até 10% desta farinha, associada a farinha de trigo tradicional, proporciona um produto com alto teor de fibra alimentar e características sensoriais aceitáveis.

## CONCLUSÃO

Os extratos etanólicos de *H. martiana* Hayne e de *A. cearensis* A. C. Smith apresentam atividade antimicrobiana sobre isolados de *Staphylococcus aureus* e *Salmonella spp.*, mas não sobre os de *E. coli*.

A este respeito, levando-se em consideração os compostos bioativos presentes em *H. martiana* e *A. cearensis*, estas espécies podem ser fonte de compostos antimicrobianos e antioxidantes. Neste sentido, este estudo serve como base de dados demonstrando que os antimicrobianos naturais podem oferecer vantagens à área de alimentos, uma vez que ao inibirem os micro-organismos patogênicos, favorecem ao aumento da sua qualidade higiênico-sanitária e da sua vida útil, além de permitirem que produtos com propriedades nutricionais sejam

introduzidos no mercado. Sendo necessário para isso, mais estudos que possam respaldar esta utilização.

## **APRESENTAÇÃO DE TRABALHO**

Extratos vegetais têm demonstrado que além de possibilitarem a estabilidade oxidativa de produtos alimentícios, podem também inibir naturalmente micro-organismos patogênicos. Diversas espécies de plantas da Caatinga são amplamente conhecidas e utilizadas na medicina popular e na produção comercial de produtos fitoterápicos. Desta forma, desperta-se o interesse no estudo da atividade antimicrobiana de *Amburana cearensis* A. C. Smith e *Hymenaea martiana* Hayne sobre micro-organismos patogênicos de origem alimentar.

## **FONTES DE AQUISIÇÃO**

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior;

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

## **REFERÊNCIAS**

ALBUQUERQUE, U. P. et al. Medicinal plants of the Caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v.114, p. 325-354, 2007.

ALIGIANIS, N. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p. 4168-4170, 2001.

BARBOSA, M. P. C. et al. **Estudo químico e avaliação de atividade biológica de folhas de *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* (Heyne) Lee & Lang**. In: 30a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2007.

BOUABDELLI, F. et al. Antimicrobial activity of 22 plants used in urolithiasis medicine in Western Algeria. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 2, s. 1, p. 530-535, 2012.

- BRASIL. Ministério da Saúde. **Dados epidemiológicos - DTA período de 2000 a 2011**.2011.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Biodiversidade da caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação**. Brasília: Universidade Federal de Pernambuco.2003. 382p.
- BRAVO, J. A. et al. Bioactive phenolic glycosides from *Amburana cearensis*. **Phytochemistry**, v. 50, p. 71-74, 1999.
- CARNEIRO, E. et al. Isolation, chemical identification and pharmacological evaluation of aucryphin, astilbin and engelitin obtained from the bark of *Hymenaea martiana*. **International Journal of Pharmacognosy**, v. 31, n. 1, p. 38-46, 1993.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: Approved standards**. Document CLSI M7-A7, CLSI, 2006.
- CORREA, M. P.; PENNA, L. A. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**, v. 1, Brasília: Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Brasil, 1984. In: LEAL, L. K. A. M. et al. A comparative chemical and pharmacological study of standardized extracts and vanillic acid from wild and cultivated *Amburana cearensis* A. C. Smith. **Phytomedicine**, v. 18, p. 230–233, 2011.
- DUARTE, M. C. T., 2007. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Multiciência**, v. 7, p. 1-16, 2007.
- CROTEAU, R. et al. 2000. Natural products (Secondary Metabolites). In: FUMAGALI, E. et al. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 4, p. 627-641, 2008.
- FERNANDES, T. T. et al. Atividade antimicrobiana das plantas – *Plathymenia reticulata*, *Hymenaea courbaril* e *Guazuma ulmifolia*. **Revista de Patologia Tropical**, v. 34, n. 2, p. 113-122, 2005.

GONÇALVES, A. L. et al. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 3, p. 353-358, 2005.

GRANATO, D. et al. Chemical and biological evaluation of rejects from the wood industry. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 237-241, 2005.

LEAL, L. K. A. M. Anti-inflammatory and Smooth Muscle relaxant activities of the hydroalcoholic extract and chemical constituents from *Amburana cearensis* A. C. Smith. **Phytotherapy Research**, v. 17, p. 335-340, 2003.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA: São Paulo, 2002. 512p.

MARTINS, S. et al. Antibacterial activity of crude methanolic extract and fractions obtained from *Larrea tridentata* leaves. **Industrial Crops and Products**, v. 41, p. 306– 311, 2013.

MELO, J. G. et al. Qualidade de produtos à base de plantas medicinais comercializados no Brasil: castanha-da-índia (*Aesculus hippocastanum* L.), capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf ) e centela (*Centella asiatica* (L.) Urban). **Acta Botânica Brasileira**, v. 21, n. 1, p. 27-36, 2007.

NOGUEIRA, R. T. et al. Clerodane-type diterpenes from the seed pods of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa*. **Phytochemistry**, v. 58, n. 8, p. 1153-1157, 2001.

NOVAIS, T. S. et al. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semiárido brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, s. 2, p. 5-8, 2003.

OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PEIXOTO, R. M. **Mastite em pequenos ruminantes: etiologia, fatores de risco, diagnóstico e sensibilidade aos agentes antimicrobianos e extratos de plantas**. 2009. 129p. Dissertação

(Mestrado em Ciência Animal), Programa de Pós- graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, Petrolina, PE.

PEREIRA, C. K. B. et al. Composição química, atividade antimicrobiana e toxicidade do óleo essencial de *Hymenaea courbaril* (jatobá). In: 30<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, São Paulo, 2007.

PEREIRA, M. C. et al. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 4, p. 731-738, 2006.

QUINN, P. J. et al. Agentes antimicrobianos. In: \_\_\_\_\_ **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. 3ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. Cap. 6, p. 42-49.

SÁ, M. C. A. et al. Antimicrobial activity of Caatinga biome ethanolic plant extracts against gram negative and positive bacteria. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 18, n. 2/3, p. 62-66, 2011.

SANTOS, D. Y. A. C. et al. **Curso para atualização de professores de Educação Básica: A Botânica no cotidiano**. 2008. 124 p. São Paulo: Universidade de São Paulo, Fundo de Cultura e Extensão: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Botânica. Projeto de Cultura e Extensão Ensino de Botânica.

SILVA, M. E. G. C. HPLC-DAD analysis and antioxidant activity of *Hymenaea martiana* Hayne (Fabaceae). **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 4, n. 2, p. 1160-1166, 2012.

SILVA, M. R. et al. Utilização tecnológica dos frutos de Jatobá-do-cerrado e de Jatobá-da-mata na elaboração de biscoitos fontes de fibra alimentar e isentos de açúcares. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 2, p. 176-182, 2001.

SILVA, J. G. et al. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 4, p. 572-577, 2007.

SIVROUPOULOU, A. et al. Antimicrobial activity of mint essential oils. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 9, p. 2384-2388, 1995.

TAUXE, R.V.et al. Evolving public health approaches to the global challenge of foodborne infection. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, p.16-28, 2010.

TURINA, A. V. et al. Natural terpenes: selfassembly and membrane partitioning. **Biophysical Chemistry**, v. 122, p.101-113, 2006.

VALENTIM, A. P. T. **Atividade antimicrobiana, estudo fitoquímico e identificação de constituintes apolares do alburno de *Hymenaea stagnocarpa* Matr. Ex. Hayne (jatobá)**. 2006. 100p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos), Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Produtos Bioativos, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife, PE.

## **COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA**

**Efeito antiaderente *in vitro* de *Hymenaea martiana* Hayne frente a *Staphylococcus aureus* isolados de leite**

**(Encaminhada para o “Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia”)**

## **Efeito antiaderente *in vitro* de *Hymenaea martiana* Hayne sobre *Staphylococcus aureus* isolados de leite**

[*Antiadherent effect in vitro of Hymenaea martiana* Hayne about *Staphylococcus aureus* isolated from milk]

### **RESUMO**

Avaliou-se o efeito antiaderente *in vitro* de *Hymenaea martiana* Hayne sobre *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite provenientes do semiárido pernambucano e baiano. Através da obtenção da absorbância realizada em leitor de microplacas a 595nm, observou-se que o biofilme consolidado apresentou 60% de redução com a concentração de 781,2µg/mL, e que todas as concentrações utilizadas inibiram o biofilme em formação. Concluiu-se que o extrato de *H. martiana* Hayne apresentou atividade antiaderente sobre biofilme de *S. aureus*, podendo ser considerado uma fonte de compostos inibidores de biofilme microbianos.

**Palavras-chave:** Bioma Caatinga, Biofilme, Micro-organismo patogênico, Alimentos.

### **ABSTRACT**

Evaluated the *in vitro* effect of *Hymenaea martiana* Hayne about *Staphylococcus aureus* isolates from milk samples from the semiarid region of Pernambuco and Bahia, Brasil. By obtaining the absorbance in microplate reader held in the 595nm, observed that biofilm consolidated showed 60% reduction in the concentration of 781,2 µg/mL, and all the used concentrations inhibited biofilm formation. It was concluded that the extract of *H. martiana* Hayne showed anthiaderent activity on biofilm *S. aureus*.

**Keywords:** Biofilm. Caatinga biome. Food. Pathogenic microorganism.

Os biofilmes são comunidades microbianas constituídas de células planctônicas que se aderem a um substrato, passam ao estado sésil, proliferam e se acumulam em camadas, estando inclusas em uma matriz de exopolissacarídeos (Donlan e Costerton, 2002). Dentre os micro-organismos relacionados à formação destas estruturas, *Staphylococcus aureus* merecem destaque, sendo sua presença em alimentos um indicativo de contaminação a partir da pele, da boca e das fossas nasais de manipuladores. Além disso, micro-organismos do gênero *Staphylococcus* são relacionados a casos de mastite bovina, sendo sua identificação em leite e derivados de grande importância (Fagundes e Oliveira, 2004).

Na indústria de beneficiamento de leite, práticas inadequadas de manejo e de higienização em equipamentos de ordenha e no beneficiamento, assim como a conservação inadequada, tornam o leite suscetível à contaminação. Além disso, estas práticas inadequadas podem promover a formação de biofilmes em tanques de armazenamento e trocadores de calor, e ainda, adesão de esporos na superfície de embalagens (Franco et al., 2000; Haun, 2004).

As propriedades antimicrobianas e antiaderentes de extratos vegetais têm sido estudadas com relação aos micro-organismos patogênicos presentes em alimentos. O Jatobá (*Hymenaea martiana* Hayne), conhecido popularmente na região semiárida pernambucana e baiana, é bastante utilizado devido a ações como antifúngica, antimicrobiana, antioxidante, diurética, expectorante, hepatoprotetora, carminativa, adstringente, estimulante e energética (Lorenzi e Matos, 2002).

Diante do exposto, objetivou-se avaliar o efeito antiaderente *in vitro* de *Hymenaea martiana* Hayne sobre *Staphylococcus aureus* isolados de amostras de leite provenientes de rebanhos bovinos de propriedades rurais existentes no semiárido pernambucano e baiano.

Sendo assim, o material vegetal foi coletado em Petrolina, Pernambuco, Brasil, identificado por um botânico responsável, sendo sua exsiccata codificada e depositada no Herbário da Universidade Federal do Vale do São Francisco (HVASF). Após obtenção do extrato etanólico bruto (EEB), 0,25g foram diluídos em 10mL de água destilada estéril, obtendo-se uma solução estoque na concentração de 25mg/mL.

Foram utilizados onze isolados, sendo nove de *Staphylococcus aureus* obtidos de amostras de leite provenientes de rebanhos bovinos dos municípios de Petrolina e região (Afrânio, Santa Maria da Boa Vista-PE e Senhor do Bonfim-BA) pertencentes à bacterioteca do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da UNIVASF, e previamente classificadas como fortes produtoras de biofilme, um isolado clínico “methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*” (ATCC 25923) e uma cepa *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) não produtora

de biofilme, de acordo com Mariana *et al.* (2009), como controle negativo. Alíquotas de cada isolado foram inoculadas em tubos contendo 10mL de caldo triptona de soja (TSB) suplementado com glicose 1%, atingindo a escala 1 de MacFarland, seguindo-se de incubação em estufa a 37°C por 24h. De cada suspensão obtida após esse período, 100µl foram retirados e adicionados a placas de microtitulação com 96 poços para serem previamente submetidas aos testes de aderência. Para avaliar a interferência do extrato com o biofilme já consolidado, as microplacas contendo os 100µl das suspensões bacterianas foram submetidas à incubação em estufa a 37°C por 24h para a formação prévia do biofilme. Sendo, em seguida, realizadas três lavagens dos poços com 200µl de água destilada estéril. A partir disso, foram acrescentados 200µl do extrato nas concentrações 3.125; 781,2; 195,3 e 97,6µg/mL (2; 0,5; 0,125 e 0,0625 CBM, respectivamente), a partir de prévia avaliação *in vitro* da concentração bactericida mínima (CBM) do extrato sobre os isolados de *S. aureus* selecionados. O isolado de *S. epidermidis* foi avaliado nas quatro concentrações do extrato utilizadas, devido a não determinação prévia da sua CBM.

A densidade ótica (DO) dos poços foi determinada imediatamente após a adição do extrato (0h) e 24h depois, em leitor de microplacas a 595nm, sendo a interferência dos extratos no biofilme consolidado definida pela equação:  $100 - [(DO_{24h} \text{ média} / DO_{0h} \text{ média}) \times 100]$ . Adaptado de Marino *et al.* (2010). Na avaliação da interferência do extrato com o biofilme em formação, as microplacas contendo 100µl das suspensões bacterianas receberam também 100µl do extrato, seguindo-se de incubação em estufa a 37°C por 24h. A partir disso, os poços foram lavados como descrito acima e logo em seguida, corados com 100µl de Violeta de Giensiana a 0,25% por 3 minutos. Todos os poços foram novamente lavados e, por fim, utilizou-se 200µl de álcool-acetona (80:20) para diluição dos cristais dentro dos poços. A absorbância foi medida em leitor de microplacas a 595nm. Para determinar o grau de aderência, foram utilizadas as equações:  $DO_{Im} < DO_{CNm}$  = negativo;  $DO_{CNm} < DO_{Im} < 2 \cdot DO_{CNm}$  = fraco;  $2 \cdot DO_{CNm} < DO_{Im} < 4 \cdot DO_{CNm}$  = moderado;  $DO_{Im} > 4 \cdot DO_{CNm}$  = forte, onde: I – Isolado de *S. aureus*; CN- Controle negativo (Cepa de *S. epidermidis*);  $DO_{Im}$  – Densidade ótica média do isolado;  $DO_{CNm}$  – Densidade ótica média do controle negativo. Adaptado de Merino *et al.* (2009). Para assegurar que o meio de cultura manteve-se estéril durante o experimento, poços contendo apenas meio foram mantidos em todas as placas. Os testes foram realizados em triplicata.

Na avaliação da atividade de *H. martiana* frente às cepas de *S. aureus*, no que diz respeito ao biofilme consolidado, os valores estão representados na Tab. 1. Em uma avaliação geral, o percentual de redução do biofilme consolidado foi de 60%. A cepa ATCC e os demais isolados

avaliados na concentração de 781,2µg/mL (0,5 CBM) apresentaram diminuição no biofilme, porém os demais isolados, avaliados nas concentrações 97,6µg/mL (0,0625 CBM), 195,3µg/mL (0,125 CBM) e 3.125µg/mL (2 CBM) apresentaram aumento. Em relação aos valores de absorvância da cepa *S. epidermidis* (controle negativo) observou-se aumento da absorvância final, em relação à avaliada na hora zero.

Tabela 1. Efeito *in vitro* do extrato etanólico de *Hymenaea martiana* Hayne sobre o biofilme consolidado de *Staphylococcus aureus* obtidos de amostras de leite do semiárido pernambucano e baiano.

C <sub>extrato</sub> (µg/mL)	Isolado	Absorvância		Biofilme (%)
		DO <sub>0hm</sub>	DO <sub>24hm</sub>	
781,2	1	0,113	0,80	< 29,21
	2	0,126	0,123	< 2,4
	3	0,136	0,128	< 5,9
	4	0,140	0,134	< 4,3
	5	0,127	0,121	< 0,799
	6	0,118	0,112	< 5,0
97,6	7	0,054	0,071	> 31
	8	0,067	0,084	> 25
195,3	9	0,061	0,063	> 3,2
3.125	10	0,478	0,526	> 10,04

C<sub>extrato</sub> – Concentração do extrato; Isolado 1- cepa ATCC 25923; DO<sub>0hm</sub> -Absorvância média na hora 0; DO<sub>24hm</sub> – Absorvância média 24 horas depois; Percentual de alteração no biofilme:  $100 - [(DO_{24hm}/DO_{0hm}) \times 100]$ .

No que diz respeito ao biofilme em formação, os resultados encontram-se na Tab. 2. Observou-se 100% (n=10/10) de interferência na formação do biofilme nas cepas testadas. Em todas as concentrações (2; 0,5; 0,125 e 0,0625 CBM) a intensidade de formação do biofilme, antes forte, foi avaliada como fraca. A atuação do extrato sob o biofilme em formação demonstra-se satisfatória, já que as cepas utilizadas eram caracterizadas como fortes formadoras de biofilme, como descrito anteriormente, e após a interação com o extrato formaram fracas aderências.

Tabela 2. Efeito *in vitro* do extrato etanólico de *Hymenaea martiana* Hayne sobre o biofilme em formação de *Staphylococcus aureus* obtidos de amostras de leite do semiárido pernambucano e baiano.

$C_{\text{extrato}}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Isolado	$DO_{\text{Im}}$	$DO_{\text{CNm}}$	Formação do Biofilme
781,2	1	0,064	0,056	Fraca
	2	0,072	0,056	Fraca
	3	0,072	0,056	Fraca
	4	0,076	0,056	Fraca
	5	0,073	0,056	Fraca
	6	0,074	0,056	Fraca
	7	0,081	0,068	Fraca
97,6	8	0,092	0,068	Fraca
195,3	9	0,068	0,061	Fraca
3.125	10	0,097	0,065	Fraca

$C_{\text{extrato}}$  – Concentração do extrato utilizada;  $DO_{\text{Im}}$  – Densidade ótica média do isolado;  $DO_{\text{CNm}}$  – Densidade ótica média do controle negativo; Intensidade de formação do biofilme obtida pelas equações ( $DO_{\text{Im}} < DO_{\text{CNm}}$  = negativo;  $DO_{\text{CNm}} < DO_{\text{Im}} < 2 \cdot DO_{\text{CNm}}$  = fraco;  $2 \cdot DO_{\text{CNm}} < DO_{\text{Im}} < 4 \cdot DO_{\text{CNm}}$  = moderado;  $DO_{\text{Im}} > 4 \cdot DO_{\text{CNm}}$  = forte, onde: 1 – Isolado de *S. aureus*; CN- Controle negativo (Cepa de *Staphylococcus epidermidis*).

Em relação à atividade do extrato sobre o biofilme consolidado, a partir das absorvâncias obtidas antes e depois da interação dos isolados com o extrato, percebeu-se que a maior redução de biofilme foi da cepa ATCC, sendo esta de 29,21%. Já um maior aumento de biofilme foi observado no isolado submetido à concentração de 3.125 $\mu\text{g/mL}$  (2 CBM), sendo este de 10,04%.

A esse respeito, Linhares e Ximenes (2011) avaliando extrato de *Hymenaea stignocarpa* Mart. Ex. Hayne frente a fatores de virulência de *S. aureus*, relataram o aumento na expressão de alguns fatores quando os isolados foram expostos a concentrações subinibidoras de agentes antimicrobianos. Isto pode justificar as divergências de susceptibilidade das cepas em relação às suas respectivas concentrações subinibitórias no presente estudo.

Importante ressaltar que quando em forma de biofilme, os micro-organismos são mais resistentes aos materiais utilizados para a limpeza e sanitização. De acordo com Drenkard (2003), os micro-organismos em biofilme são de quinhentas a mil vezes mais resistentes do que as em estado livre, o que explica também a resistência quando são confrontados com agentes antimicrobianos naturais. Sendo assim, é mais fácil a inibição de um biofilme em formação do que de um biofilme já estabelecido, pois a presença do extrato na superfície induz a formação de um filme condicionador desfavorável, dificultando a aderência dos micro-organismos. Já com o biofilme consolidado, a matriz exopolimérica dificulta a atuação do extrato sobre os micro-organismos aderidos, funcionando como uma barreira protetora

Além disso, fatores tais como a possível interação entre o agente antimicrobiano com a matriz, a resistência mediada por enzimas, os níveis de atividade metabólica dentro da estrutura, a composição da membrana externa, dentre outros fatores, exercem um papel importante na resistência à penetração das substâncias ativas dos produtos utilizados (Pereira, 2001; Caixeta, 2008).

Por outro lado, a atividade antiaderente demonstrada pelo extrato pode ser explicada pela presença de compostos bioativos. Em relação a isto, Silva et al. (2012), relataram que o extrato etanólico de *H. martiana* continha quantidade substancial de compostos fenólicos, como flavonoides, terpenoides e esteroides.

É importante levar em consideração que o teor destes compostos relaciona-se a fatores tais como o crescimento da espécie no ambiente, a técnica utilizada para a sua colheita, e ainda, o ciclo vegetativo, as partes escolhidas, as condições de solo e a sazonalidade. Complementando, os resultados de estudos que envolvam produtos vegetais podem sofrer influência dos diferentes padrões de resistência apresentados pelas cepas dos micro-organismos, a origem da cepa e as características inerentes ao gênero em questão. Relevante também é o fato de que a matriz exopolissacarídea secretada para o meio externo é capaz de impedir fisicamente a penetração de agentes antimicrobianos no biofilme. Além disso, a técnica escolhida para avaliação dos compostos presentes no material vegetal e a composição química de algumas preparações também podem resultar em dados de difícil comparação entre as pesquisas (Sivroupoulou *et al.*, 1995; Ostrosky *et al.*, 2008; Kasnowski *et al.*, 2010; Bouadbelli *et al.*, 2012).

A partir dos resultados encontrados, pode-se concluir que o extrato de *H. martiana* Hayne apresentou atividade antiaderente sobre as cepas de *S. aureus* isoladas de leite, podendo assim, a *H. martiana* Hayne ser considerada uma fonte de compostos inibidores de biofilme microbiano. Sendo assim, a utilização de extratos desta planta apresenta-se como uma alternativa natural na inibição de biofilme por micro-organismos na indústria de alimentos, sendo necessário o desenvolvimento de mais pesquisas a este respeito.

BOUABDELLI, F.; DJELLOUL, A.; KAID-OMAR, Z. et al. Antimicrobial activity of 22 plants used in urolithiasis medicine in Western Algeria. *Asian Pac. J. Trop. Dis.*, v. 2, n. 1, p. 530-535, 2012.

CAIXETA, D. S. *Sanificantes químicos no controle de biofilmes formados por duas espécies de Pseudomonas em superfície de aço inoxidável*. 2008. 75f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola), Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais.

- DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.
- DRENKARD, E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect.*, v. 5, n. 13, p. 1231-1219, 2003.
- FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C. A. F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. *Ciênc. Rural*, v. 34, n. 4, p. 1.315-1.320, 2004.
- FRANCO, CAVALCANTI, R. M. S.; WOOD, P. C.B. et al. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de leite e derivados. *Hig. Aliment.*, v.14, n.68, p.70-77, 2000.
- HAUN, M. A. D. *Avaliação da eficiência de um esterilizador a plasma na inativação de Pseudomonas fluorescens*. 2004. 71f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.
- HERRERA, J. J. R.; CABO, M. L.; GONZÁLEZ, A. et al. Adhesion and detachment kinetics of several strains of *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* under three different experimental conditions. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 24, n. 6, p. 585-591, 2007.
- KASNOWSKI, M. C.; MANTILLA, S. P. S.; OLIVEIRA, L. A. T.; FRANCO, R. M. Formação de biofilme na indústria de alimentos e métodos de validação de superfícies. *Rev. Cient. Elet. Med. Vet.*, n. 15, 2010.
- LINHARES, L. A.; XIMENES, E. C. P. A. Efeito da concentração subinibitória do extrato de *Hymenaea stigonocarpa* Mart. Ex. Hayne sobre os fatores de Virulência de *Staphylococcus aureus*. In: XIX CONIC, III CONITI, VII JOIC, Recife, Universidade Federal de Pernambuco, 2011.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA: São Paulo, 2002. 512p.
- MARIANA, N. S.; SALMAN, S.A.; NEELA, V.; ZAMBERI, S. Evaluation of modified Congo red agar for detection of biofilm produced by clinical isolates of methicillin-resistance *Staphylococcus aureus*. *Afr. J. Microbiol. Res.*, v. 3, n. 6, p. 330-338, 2009.
- MARINO, A.; BELLINGHERI, V.; NOSTRO, A. et al. In vitro effect of branch extracts of *Juniperus* species from Turkey on *Staphylococcus aureus* biofilm. *Immunol. Med. Microbiol.*, v.59, p. 470–476, 2010.
- MERINO, N.; TOLEDO-ARANA, A.; VERGANA-IRIGARAY, M. et al. Protein A-Mediated Multicellular Behavior in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, v. 191, n. 3, p. 832–843, 2009.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Braz. J. Pharmacogn.*, v.18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PEREIRA, O. B. O. *Comparação da eficácia de dois biocidas (carbamato e glutaraldeído) em sistemas de biofilme*. 2001. 211f. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica), Universidade do Minho, Braga.

SILVA, M. E. G. C.; GUIMARÃES, A. L.; OLIVEIRA, A. P. HPLC-DAD analysis and antioxidant activity of *Hymenaea martiana* Hayne (Fabaceae). *J. Chem. Pharma. Res.*, v. 4, n. 2, p. 1160-1166, 2012.

SIVROUPOULOU, A.; KOKKINI, S.; LANARAS, T.; ARSENAKIS, M. Antimicrobial activity of mint essential oils. *J. Agric. Food Chem.*, v. 43, p. 2384-2388, 1995.

## CONCLUSÃO

Em relação à atividade antimicrobiana, os extratos etanólicos de *Hymenaea martiana* Hayne e de *Amburana cearensis* A. C. Smith apresentaram atividade antimicrobiana sobre os isolados de *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp., mas não sobre os de *Escherichia coli*. No que diz respeito à atividade antiaderente, o extrato de *H. martiana* Hayne apresentou atividade antiaderente frente às cepas de *S. aureus*.

*H. martiana* e *A. cearensis* podem ser consideradas fonte de compostos antimicrobianos e antioxidantes naturais, e *H. martiana* também como fonte de compostos antiaderentes. Neste sentido, este estudo serve como base de dados demonstrando que os produtos naturais podem oferecer vantagens à área de alimentos, uma vez que ao inibirem os micro-organismos patogênicos, favorecem ao aumento da sua qualidade higiênico-sanitária e da sua vida útil, além de permitirem que produtos com propriedades nutricionais sejam introduzidos no mercado. Sendo necessário para isso, mais estudos que possam respaldar esta utilização.

Ressalta-se a este respeito, que por serem constituídas de compostos químicos diversos, as plantas podem apresentar diferentes respostas em relação aos micro-organismos testados e às condições intrínsecas de cada alimento. Tornando-se necessário avaliar o material vegetal diretamente no produto ou em um sistema que simule a composição do alimento em questão, além dos testes *in vitro*.

Importante também é avaliar fitoquimicamente a espécie vegetal a fim de constatar os seus compostos, para suas atividades biológicas, farmacológicas e/ou tóxicas, seguindo as recomendações específicas, descritas em legislações e em publicações que regem a utilização de material vegetal, garantindo a segurança de sua utilização.