

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

ANA CAROLINY VIEIRA DA COSTA

PERFIL QUÍMICO E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA *in vitro* E
EM MATRIZ ALIMENTAR DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Croton*
rhamnifolioides Pax & Hoffm.

JOÃO PESSOA – PB

2011

ANA CAROLINY VIEIRA DA COSTA

PERFIL QUÍMICO E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA *in vitro* E
EM MATRIZ ALIMENTAR DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Croton*
rhamnifolioides Pax & Hoffm.

JOÃO PESSOA – PB

2011

ANA CAROLINY VIEIRA DA COSTA

PERFIL QUÍMICO E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA *in vitro* E
EM MATRIZ ALIMENTAR DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Croton*
rhamnifolioides Pax & Hoffm.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos.

Orientador: Prof^o. Dr. Vicente Queiroga Neto

JOÃO PESSOA – PB

2011

C837p Costa, Ana Caroliny Vieira da.
Perfil químico e atividade antibacteriana in vitro e em matriz alimentar do óleo essencial de *Cróton rhamnifolioides* Pax & Hoffm / Ana Caroliny Vieira da Costa.- João Pessoa, 2011.
.101f. : il.
Orientador: Vicente de Queiroga Neto
Dissertação (Mestrado) – UFPB/CT
1. Tecnologia de alimentos. 2. *Croton rhamnifolioides*.
3. Óleo essencial. 4. Atividade antimicrobiana.

UFPB/BC

CDU: 664(043)

ANA CAROLINY VIEIRA DA COSTA

PERFIL QUÍMICO E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO
ESSENCIAL *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm *in vitro* E EM MATRIZ
ALIMENTAR FRENTE A BACTERIAS PATOGÊNICAS

Dissertação aprovada em 24 / 10 /2011.

Dissertação apresentada em cumprimento
aos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Ciências e Tecnologia de
Alimentos da Universidade Federal da
Paraíba.

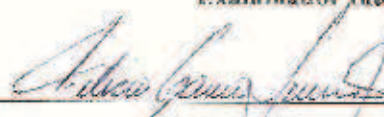
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Vicente Queiroga Neto – PPGCTA/CT/UFPB
Coordenador da Banca Examinadora



Prof. PhD. Marta Suelly Madruga – PPGCTA/CT/UFPB
Examinador Interno



Prof. Dr. Felício Garino Júnior – PPGMV/CSTR/UFCG
Examinador Externo

À minha família por todo apoio e incentivo,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter sempre me agraciado e acompanhado em todos os momentos;

Aos meus pais, Maria Suely Vieira Sá da Costa e Aluisio Belo da Costa Filho e irmão Aluisio Neto e Patrícia Vieira, cada um do seu modo e com a sua forma de expressão de amor. Obrigada pelas lições de vida, dedicação e por toda minha formação dada ao longo desses anos;

A Allan Patrick, pelo inestimável apoio, incentivo, carinho, paciência, compreensão, suporte nos momentos difíceis e companheirismo manifestados ao longo desses anos;

Ao meu orientador Prof^o Vicente Queiroga Neto, pela orientação e incentivo à realização deste trabalho;

Ao Prof^o Felício Garino, pelas preciosas contribuições, atenção, dedicação e disponibilização das instalações laboratoriais, proporcionando as condições necessárias à execução dos experimentos;

À Coordenadora de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFPB e membro da banca, Prof^a. Marta Suely Madruga, pelas valiosas contribuições ao trabalho, apoio e assistência constante durante o curso;

Aos professores Jair e Maria de Fátima do Herbário da UFCG/Patos, pela identificação da espécie vegetal estudada;

Aos funcionários Gilvandro UFPB/CT, Nonato UFPB/LTF, Tatiana UFPB/Bananeiras e Alexandre UFCG/Patos, pela atenção, disponibilidade, gentileza e suporte oferecidos na realização dos experimentos;

Ao Prof^o Augusto da UFCG/Sumé pelo auxílio na realização das coletas;

A Onaldo Guedes Rodrigues UFCG/Patos e José Galberto Martins/URCA pelo auxílio na viabilização das análises de CG-EM;

A Ana Raquel, pelo grande auxílio no processo de elaboração dos queijos;

A Geíza Azeredo e Jossana Pereira, pelo fornecimento de algumas cepas utilizadas na pesquisa;

Ao Prof^o Evandro Leite de Sousa e a Prof^a Mária Lúcia da Conceição, por terem me apresentado ao universo da pesquisa e me dado as primeiras oportunidades ainda no período da graduação. Muito obrigada pela confiança, apoio e incentivo para seguir em frente, vocês tem papel fundamental na minha formação acadêmica.

A Geisyanne Fernandez, companheira de todos os momentos, muito obrigada pelo apoio, paciência e ajuda na execução das análises laboratoriais;

A Prof^a Rosália Severo de Medeiros, pela atenção, assistência, gentileza e apoio durante a realização dos experimentos na cidade de Patos;

Aos companheiros de laboratório Arthur, Rodrigo e Ramon pela agradável convivência, espírito cooperativo, momentos de descontração, conversas e risadas mesmo durante os dias de trabalho intermináveis;

Aos colegas de turma do mestrado, pela amizade, incentivo, agradável convívio e troca de experiências;

A minha amiga Lauricélia e sua família, pela amizade, carinho, assistência e por ter me recebido sempre de braços abertos em sua casa na cidade de Patos;

Aos meus grandes amigos Nelson Justino, Maria Eugênia, Nara Raquel, Amanda, Anna Júlia e Jânio Junior, muito obrigada pela amizade, incentivo, ajudas, atenção, preocupação, carinho, momentos de alegria e por estarem sempre ao meu lado;

Ao secretário do Programa de Pós-graduação, Humberto Bandeira, pelos auxílios prestados no decorrer do curso;

Aos professores, técnicos e funcionários do Programa de Pós-Graduação de Ciências e Tecnologia de Alimentos da UFPB, minha gratidão pelo pelas grandiosas informações e experiências adquiridas no decorrer do curso;

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos;

E a todos que de alguma forma colaboraram para a realização desta dissertação e que não foram aqui explicitamente citados, mas a quem expresseo o meu mais profundo agradecimento.

RESUMO

A busca de compostos alternativos para um emprego racional na conservação de alimentos a fim de atender a demanda de consumidores por produtos mais seguros, naturais e com vida de prateleira prolongada, tem atraído um grande interesse científico para a investigação de várias espécies de plantas aromáticas, medicinais e condimentares, em função do seu potencial como fonte de agentes naturais. Em especial, os óleos essenciais, tem recebido grande atenção devido a sua comprovada propriedade antimicrobiana. O objetivo deste estudo foi investigar a composição química do óleo essencial de *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm. e o efeito inibitório sobre o crescimento de cepas de bactérias de interesse em alimentos *in vitro* e em matriz alimentar. A identificação e quantificação dos componentes do óleo essencial foram realizadas através de cromatografia gasosa – espectrometria de massa (CG-EM). A análise preliminar da atividade antimicrobiana foi realizada através da técnica de difusão em meio sólido, a Concentração Inibitória Mínima-CIM foi determinada através da técnica de macrodiluição, enquanto a interferência de diferentes concentrações do óleo essencial sobre a viabilidade microbiana foi realizada através da contagem de células viáveis. Foi avaliado, ainda, a efetividade do óleo em inibir a microbiota do queijo minas frescal ao longo de 15 dias. A análise de CG-EM mostrou 1,8-cineol (46,32%) como o composto prevalente no óleo essencial ensaiado, seguido por 1-felandreno (16,70%), p-cimeno (10,21%), sabineno (8,14%) e trans-cariofileno (4,81%). Os valores de CIM e CBM do óleo essencial oscilaram de 2,5 - 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ e 5 - 40 $\mu\text{L}/\text{mL}$, respectivamente. O óleo essencial de *Croton rhamnifolioides* em concentrações referentes ao CIM e CIM/2 afetou a viabilidade celular de todas as bactérias ensaiadas ao longo de 12 horas. Quando inserido na composição do queijo minas frescal, o óleo essencial em concentrações superiores a 1% mostrou capacidade de inibição da sua microbiota, em relação ao controle. Estes resultados demonstram que o óleo essencial de *Croton rhamnifolioides* apresenta atividade antibacteriana, o que o torna uma alternativa para uso, em conjunto com outros métodos de conservação, no controle do crescimento de microorganismos patogênicos e deterioradores em alimentos.

Palavras-chave: Atividade antimicrobiana. Óleo essencial. *Croton rhamnifolioides*.

ABSTRACT

The search for alternative compounds to develop a rational use in food conservation in order to answer to a customers' demand for safer, more natural and resistant products has attracted a massive scientific interest on the investigation of various medicinal and aromatic plants and condiments due to their high potential as natural agents. In special, the essential oils have received a great attention because of their proven antimicrobial property. The aim of this study was to investigate the chemical composition of the essential oil *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm. and its inhibitory effect in the development of strains of bacteria of interest in *in vitro* food and in food matrix. The identification and quantification of the essential oil compounds was done through a gas chromatography – mass spectrometry (CG-MS). The preliminary analysis of antimicrobial activity was done through the diffusion in solid technique, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined through the technique of macrodilution while the interference of different concentrations of the essential oil through the microbial viability was realized through the viable cell count. It was also evaluated the effectiveness of the oil in inhibit the microbiota of fresh cheese during a fifteen-day period. The CG-MS analysis presented 1,8-cineol (46,32%) as the prevailing compound in this essential oil, followed by 1-phellandrene (16,70%), p-cymene (10,21%), sabinene (8,14%) and trans-cariophyllene (4,81%). The MIC and CBM values of the essential oil oscillate from 2,5 - 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ and 5 - 40 $\mu\text{L}/\text{mL}$, respectively. The essential oil of *Croton rhamnifolioides* in concentration whose references are MIC and MIC/2 affected the cellular viability of all bacteria tested along 12 hours. When inserted in the composition of the fresh cheese, the essential oil in concentrations that were superior from 1% showed the inhibition capacity of its microbiota related to its control. These results demonstrate that the essential oil of *Croton rhamnifolioides* presents an antimicrobial activity that transforms it in a good alternative for use, along with other conservation methods on the control of pathogenic and deteriorative micro-organisms growth in food.

Keywords: Antimicrobial activity. Essential oil. *Croton rhamnifolioides*.

LISTA DE ILUSTRAÇÃO

Figura 1	<i>Croton rhamnifolioides</i>	17
Figura 2	Representação básica de um fenilpropanóide (A) e isopreno (B)	20
Figura 3	Interação dos seis patótipos de <i>Escherichia coli</i> diarreio gênicas com a célula alvo.....	32
Figura 4	Procedimentos sequenciais para elaboração do queijo minas frescal adicionado de óleo essencial.....	48
 Artigo 1		
Figura 1	Efeito do óleo essencial de <i>Croton rhamnifolioides</i> sobre a viabilidade celular de <i>Aeromonas hydrophila</i> : (■) controle (0 µL/mL); (●) CIM/2 (2,5 µL/mL); (▲) CIM (5 µL/mL); (▼) CIM x 2 (10 µL/mL).....	63
Figura 2	Efeito do óleo essencial de <i>Croton rhamnifolioides</i> sobre a viabilidade celular de <i>Listeria monocytogenes</i> : (■) controle (0 µL/ml); (●) CIM/2 (1,125 µL/mL); (▲) CIM (2,5 µL/mL); (▼) CIM x 2 (5 µL/mL).....	64
Figura 3	Efeito do óleo essencial de <i>Croton rhamnifolioides</i> sobre a viabilidade celular de <i>Staphylococcus aureus</i> : (■) controle (0 µL/mL); (●) CIM/2 (2,5 µL/mL); (▲) CIM (50 µL/mL); (▼) CIM x 2 (10 µL/mL).....	65
Figura 4	Efeito do óleo essencial de <i>Croton rhamnifolioides</i> sobre a viabilidade celular de <i>Escherichia coli</i> : (■) controle (0 µL/mL); (●) CIM/2 (10 µL/mL); (▲) CIM (20 µL/mL); (▼) CIM x 2 (40 µL/mL).....	66
Figura 5	Efeito do óleo essencial de <i>Croton rhamnifolioides</i> sobre a viabilidade celular de <i>Salmonella</i> Enteritidis: (■) controle (0 µL/mL); (●) CIM/2 (10 µL/mL); (▲) CIM (20 µL/mL); (▼) CIM x 2 (40 µL/mL).....	67

Artigo 2

Figura 1	Fluxograma de processamento do queijo minas frescal adicionado de óleo essencial.....	73
Figura 2	Efeito da adição de óleo essencial de <i>Croton rhamnifolioides</i> em queijo minas frescal sobre o número de bactérias aeróbias mesófilas e/ou anaeróbias facultativas viáveis: (■) Controle (0 µl/g); (◆) 0,5% - 5µL/g; (●); 1% - 10 µL/g; (▲) 2% - 20 µL/g; (×) 4% - 40 µL/g.....	82
Figura 3	Efeito da adição de óleo essencial de <i>Croton rhamnifolioides</i> em queijo minas frescal sobre a contagem de colônias típicas de <i>Staphylococcus aureus</i> : (■) Controle (0 µL/g); (◆) 0,5% - 5µL/g; (●); 1% - 10 µL/g; (▲) 2% - 20 µL/g; (×) 4% - 40 µL/g.....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Condensação de unidades de isoprenos na formação de terpenóides.....	21
----------	--	----

Artigo 1

Tabela 1	Composição química do óleo essencial das folhas de <i>Croton rhamnifolioides</i>	62
----------	--	----

Tabela 2	Halos de inibição obtidos para o óleo essencial das folhas de <i>Croton rhamnifolioides</i> contra bactérias patogênicas de interesse em alimentos.....	62
----------	---	----

Tabela 3	Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima do óleo essencial de <i>Croton rhamnifolioides</i> frente a bactérias patogênicas de interesse em alimentos.....	62
----------	---	----

Artigo 2

Tabela 1	Índices físico-químicos e percentual de rendimento do óleo essencial de <i>Croton rhamnifolioides</i>	80
----------	---	----

Tabela 2	Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima do óleo essencial de <i>Croton rhamnifolioides</i> frente a bactérias patogênicas de interesse em alimentos.....	80
----------	---	----

Tabela 3	Efeito da adição de óleo essencial de <i>Croton rhamnifolioides</i> em queijo minas frescal sobre Coliformes a 37 e 45 °C.....	81
----------	--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 O gênero <i>Croton</i>	15
2.1.1 <i>Croton rhamnifolioides</i> Pax & Hoffm	16
2.2 Plantas aromáticas e medicinais	17
2.3 Óleos essenciais	19
2.4 Atividade antimicrobiana de óleos essenciais	22
2.5 Óleos essenciais em alimentos.....	25
2.6 Consideração sobre as bactérias testadas.....	28
2.6.1 <i>Aeromonas hydrophila</i>	28
2.6.2 <i>Escherichia coli</i>	30
2.6.3 <i>Listeria monocytogenes</i>	33
2.6.4 <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	36
2.6.5 <i>Staphylococcus aureus</i>	38
2.7 Mariz alimentar: Queijo Minas Frescal	41
3 MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1 Extração e análise do óleo essencial	43
3.1.1 Coleta e identificação do material	43
3.1.2 Extração do óleo essencial.....	43
3.1.3 Análise cromatográfica (CG/MS).....	44
3.1.4 Caracterização físico-química do óleo essencial	44
3.1.4.1 Determinação da densidade relativa $^{20}d_{20}$	44
3.1.4.2 Determinação do índice de refração $^{20}n_d$	44
3.1.4.3 Determinação da solubilidade do óleo em álcool	45
3.1.4.4 Cor.....	45
3.1.4.5 Aparência	45
3.2 Determinação da atividade antibacteriana do óleo essencial de <i>C. rhamnifolioides</i>	45
3.2.1 Micro-organismos utilizados, manutenção e padronização	45
3.2.2 Ensaio de difusão em placas	46
3.2.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM).....	46
3.2.4 Influência do óleo sobre a cinética microbiana	47
3.2.5 Avaliação da atividade do óleo essencial no queijo minas frescal	47
3.2.6 Análises microbiológicas.....	48
3.3 Análises estatísticas	49
4 RESULTADOS	50
4.1 Artigo 1: Composição química e atividade antibacteriana do óleo essencial das folhas de <i>Croton rhamnifolioides</i> Pax & Hoffm.....	50

4.2 Artigo 2: Atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de
Croton rhamnifolioides Pax & Hoffm. em queijo minas frescal 68

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS 83

REFERÊNCIAS 84

1 INTRODUÇÃO

Os alimentos se consolidam como um fator essencial e indispensável para a vida humana, uma vez que fornecem ao corpo a energia e os materiais destinados à sua formação e funcionamento. No entanto, sua qualidade pode ser adversamente afetada por alterações ocasionadas pela ação de fatores físicos, químicos ou microbiológicos. Dentre as alterações, a microbiológica é considerada a mais importante, pois a presença de micro-organismos indesejáveis nos alimentos pode, além de ocasionar perdas em decorrência da deterioração microbiana, provocar doenças através do consumo de alimentos contaminados (FORSYTHE, 2002; BENKEBLIA, 2004).

As Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) estão entre os maiores problemas de saúde pública no mundo contemporâneo, fato que preocupa cada vez mais os órgãos governamentais. Neste sentido, torna-se de grande importância a busca por mecanismos/procedimentos que viabilizem a redução do número de micro-organismos indesejáveis, a diminuição da velocidade de crescimento e da síntese de suas toxinas em alimentos (LEMAY et al., 2002).

Para o alcance dos objetivos relacionados à segurança e estabilidade microbiológica de seus produtos ao longo de sua vida de prateleira, as indústrias de alimentos têm feito o uso, por longos anos, de conservantes químicos. No entanto, frente ao conhecimento de que alguns conservantes químicos são suspeitos ou são tóxicos aos consumidores, à sua utilização irracional, em soma às mudanças nos padrões nutricionais e aos benefícios creditados a uma alimentação saudável, tem ocorrido uma pressão sobre a indústria alimentícia para uma progressiva diminuição na utilização de conservantes sintéticos, e consequente adoção de alternativas mais naturais para o alcance da segurança microbiológica dos alimentos (SOUZA et al., 2005; BARROS et al., 2009).

Cabe também ressaltar que, a capacidade de desenvolvimento de tolerância por parte de micro-organismos de interesse em alimentos decorrente da exposição a variados métodos e agentes antimicrobianos, tem se apresentado como importante fator motivador de mudanças nos procedimentos empregados em sistemas de conservação de alimentos (SOUZA; STAMFORD; LIMA, 2006).

Neste cenário, tem se impulsionado a realização de pesquisas em todo o mundo, enfatizando a busca de compostos alternativos para um emprego racional de conservantes

naturais na produção de alimentos, com a finalidade de atender as perspectivas de uma nova demanda dos consumidores que buscam por alimentos de boa qualidade, livres de conservantes sintéticos e com vida útil longa (BURT, 2004; SOUZA; STAMFORD; LIMA, 2006).

Entre os variados compostos estudados com vistas a um potencial uso na conservação de alimentos, os óleos essenciais, encontrados em plantas aromáticas, medicinais e condimentares, têm recebido uma atenção especial, nos últimos anos, graças às suas propriedades antimicrobianas (BAKKALI et al., 2008; BUSATA et al., 2008).

O Brasil abriga em seu ecossistema uma grande biodiversidade, com um habitat específico para plantas medicinais e aromáticas não encontradas em outras regiões do globo (MAIA, 2004). No entanto, apesar de toda importância atribuída às plantas, o seu potencial é ainda pouco explorado, sendo considerável o número de plantas que não possui suas propriedades conhecidas.

Croton rhamnifolioides Pax & Hoffm. é uma espécie endêmica do Nordeste do Brasil, bastante utilizada na medicina popular, porém ainda pouco estudada. As espécies deste gênero atraem o interesse para o seu estudo como fonte promissora de novos e interessantes compostos naturais, devido à diversidade do seu uso popular, atividades biológicas e conteúdo relativamente rico em óleo essencial, constituídos principalmente por compostos fenólicos e terpenóides, os quais são acreditados por possuírem propriedades antimicrobianas (RANDAU, 2004; DOURADO; SILVEIRA, 2005).

Diante do exposto, tendo em vista a relevância de pesquisas visando abranger esses aspectos citados, este estudo objetivou avaliar o perfil químico e a atividade antimicrobiana *in vitro* e em matriz alimentar do óleo essencial de *Croton rhamnifolioides* frente a bactérias patogênicas de interesse em alimentos. Para isto, foi realizado neste estudo: (i) extração e caracterização físico-química do óleo essencial obtido a partir das folhas do *C. rhamnifolioides*; (ii) identificação dos fitoconstituintes; (iii) determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM); (iv) análise do efeito inibitório do óleo essencial sobre a viabilidade microbiana *in vitro* e em queijo minas frescal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE O GÊNERO *Croton*

O gênero *Croton* é um dos maiores da família Euphorbiaceae com aproximadamente 1.200 espécies, distribuídas, predominantemente, no continente americano, embora possua também representantes na África, Ásia e Oceania. O Brasil é o país que apresenta a maior diversidade do gênero, com cerca de 350 espécies (GOVAERTS et al., 2000; BERRY et al., 2005).

Muitas espécies deste gênero são odoríferas e apresentam conteúdo relativamente rico em óleo essencial, que está distribuído em todos os órgãos da planta, principalmente nas folhas e nas cascas do caule. Essas espécies mostram-se de potencial valor terapêutico em virtude do amplo uso popular como plantas medicinais, na forma de chás, infusões, cataplasmas e laxativos (DOURADO; SILVEIRA, 2005).

Espécies de *Croton* atraem o interesse para o seu estudo devido à diversidade do uso popular, atividades biológicas e como fonte promissora de novos e interessantes compostos naturais bioativos (DOURADO; SILVEIRA, 2005). Os óleos essenciais e muitos de seus constituintes ativos como terpenóides, flavonóides e alcalóides apresentam propriedades terapêuticas comprovadas (FALCÃO et al., 2005; SALATINO et al., 2007).

Estudos fitoquímicos realizados com algumas espécies de *Croton* de ocorrência brasileira têm proporcionado o isolamento de 109 compostos pertencentes as mais variadas classes estruturais tais como diterpenos (35,6%), alcalóides (24,8%) flavonóides (12,8%) e triterpenos (11%) (TORRES, 2008).

Os fenilpropanóides, como anetol e derivados do eugenol, comuns nos óleos de erva-doce, cravo e manjerição têm sido relatados como os principais componentes dos óleos essenciais de espécies de *Croton* encontradas em diferentes partes do mundo, como por exemplo, *C. zehntneri* e *C. nepetaefolius*, no Brasil (MORAIS et al., 2006); *C. molambo* e *C. cuneatus* na Venezuela (SUÁREZ et al., 2005); *C. pseudonivenus* e *C. suberosus* no México (PEREZ-AMADOR; MONROY; BUSTAMANTE, 2007).

Muitas das espécies são utilizadas na medicina popular para os mais variados fins (HEDBERG et al., 1983; MACEDO; FERREIRA, 2004). Dentre as atividades farmacológicas experimentalmente comprovadas para o gênero *Croton* colocam em destaque o seu potencial

antiinflamatório (FALCÃO et al., 2005; ROCHA et al., 2008), antiulcerogênico (ALMEIDA et al., 2003), antidiabético (TORRICO et al., 2007), inibidores da enzima acetilcolinesterase (BARBOSA-FILHO et al., 2006) entre outras (PALMEIRA JÚNIOR, 2005; PERAZZO et al., 2007).

2.1.1 *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm

Croton rhamnifolioides Pax & Hoffm, conhecido popularmente como “quebra-faca” ou “caatinga branca”, é uma das plantas pertencente ao gênero *Croton*, bastante encontrada no nordeste brasileiro. Tem a forma de um subarbusto ou arbusto e é popularmente usada no tratamento de úlceras, inflamações e hipertensão (RANDAU, et al., 2004). *C. rhamnifolioides*, é referido por Randau (2001) como útil para dor de estômago, mal estar gástrico, vômitos, diarreia, desinteria e para atenuar a febre.

Apesar de uma grande variedade de dados sobre espécies de *Croton*, o conhecimento sobre *C. rhamnifolioides* é escasso. A luz do conhecimento atual, ainda é considerável o número de plantas que não possui seus mecanismos de ação compreendidos, e os estudos com essas plantas, além de trazerem vantagens do ponto de vista terapêutico, também permitem a redução de importação de drogas e o aumento do desenvolvimento econômico (FERREIRA, 1998).



Fonte: Ilustração do autor

Figura 2 - *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm

2.2 PLANTAS AROMÁTICAS E MEDICINAIS

Desde seus primórdios a humanidade faz uso das plantas aromáticas e medicinais para sua sobrevivência, inicialmente com intuito de prover alimentação e, em seguida, no tratamento de doenças (BANDONI; CZEPAK, 2008). Segundo Biazzi (2004), os primeiros registros históricos da utilização das plantas, como recurso terapêutico, datam de 5.000 anos atrás, com a utilização de plantas como o louro e tomilho pelos sumérios, se constituindo, portanto, um conhecimento milenar que faz parte da evolução humana, pois antes mesmo do aparecimento da escrita as pessoas já faziam o uso de plantas, ora como remédio, ora como alimento.

Sabe-se que as plantas constituem uma fonte inesgotável de compostos naturais potencialmente ativos, sintetizadas a partir do seu metabolismo secundário, cujos metabólitos agem na preservação e integridade das plantas (CARDOSO et al., 2001). Durante muito tempo, acreditou-se que os metabólitos secundários fossem produzidos sem uma função específica, simplesmente como produtos finais das reações. Contudo, essa visão mudou radicalmente e a cada dia descobre-se um pouco mais sobre a função desses compostos, sua utilidade para o desenvolvimento fisiológico das plantas e seu papel como mediadores das interações entre as plantas e outros organismos (SANTOS et al., 2006).

Adicionalmente, os metabólitos secundários apresentam várias atividades biológicas, muitas delas sendo de importância tanto na indústria farmacêutica quanto nas indústrias alimentícia, de cosméticos e agrônoma. Simões et al. (2007), relataram que pesquisadores da área de produtos naturais mostram-se impressionados pelo fato desses produtos encontrados na natureza revelarem uma gama quase que inacreditável de diversidades em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas.

No entanto, apesar de toda importância atribuída às plantas, o seu potencial como fonte de novos produtos naturais é ainda pouco explorado. Segundo estimativas, o número de espécies vegetais superiores pode chegar a 500.000, sendo que destas, apenas 15 a 17% foram investigadas quanto a suas propriedades biológicas (BARROS, 2008). O Brasil abriga em seu ecossistema, uma grande biodiversidade, com um habitat específico para plantas medicinais e aromáticas não encontradas em outras regiões do globo (MAIA, 2004), no entanto, ainda é considerável o número de plantas que não possui seus mecanismos de ação terapêutica estudados.

Dentre as atividades biológicas, a antimicrobiana vem sendo bastante estudada, devido ao aumento progressivo da resistência a antimicrobianos. Neste sentido, a busca de novos agentes antibacterianos derivados de produtos naturais de plantas poderia ser uma alternativa, por terem uma diversidade molecular muito superior àquelas derivadas de produtos sintéticos (OLIVEIRA et al., 2006).

Segundo Nascimento (2004), a descoberta de novos compostos antimicrobianos tem despertado interesse da comunidade científica devido a um aumento na taxa de infecções causadas por micro-organismos resistentes a diversos antibióticos. Nesse contexto, Salvat et al. (2001) relatam que muitas pesquisas com substâncias biologicamente ativas, isoladas de plantas, têm sido fontes de agentes terapêuticos.

Dentre os compostos com ação antimicrobiana presente nas plantas aromáticas e medicinais estão: compostos fenólicos (quinonas, flavonóides e taninos), alcalóides,

saponinas, carotenóides e, principalmente, os óleos essenciais, (SIMÕES et al., 2007; RESCHKE, MARQUES, MAYWORM, 2007).

2.3 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, odoríferas e líquidas produzidas pelo metabolismo secundário de plantas aromáticas, formados em células especiais e armazenados em estruturas especializadas em secreção, tais como glândulas e dutos. A síntese pode ocorrer nas flores, frutos, folhas, raízes, cascas, sementes e madeira (SANTOS, 2004; ONOFRE et al., 2008).

Também podem ser chamados de óleos voláteis, óleos etéreos ou essências, por serem de aparência oleosa à temperatura ambiente, possuírem aroma agradável e intenso, serem solúveis em solventes orgânicos apolares e apresentarem solubilidade limitada em água. Entretanto, sua principal característica é a volatilidade, diferindo, assim, dos óleos fixos, mistura de substâncias lipídicas, obtidos geralmente de sementes (SIMÕES et al., 2007; GUTIERREZ; BARRY-RYAN; BOURKE, 2008).

São geralmente incolores ou levemente amarelados e em geral são muito instáveis, principalmente na presença de ar, luz, calor, umidade e metais. Além disso, a maioria dos óleos essenciais possui índice de refração e são opticamente ativos, propriedades essas usadas na sua identificação e controle da qualidade (SIMÕES; SPITZER, 2004).

Biologicamente, os óleos essenciais realizam a função de assegurar a adaptação da planta ao meio ambiente, atuando na defesa contra o ataque dos predadores, atração de agentes polinizadores, e proteção contra a perda hídrica e aumento de temperatura. Economicamente, são utilizados como aromatizantes em alimentos, cosméticos e produtos de limpeza industriais, bem como na medicina alternativa, devido às suas propriedades biológicas (DORES et al., 2006; ONOFRE et al., 2008). Atuam como analgésicos, anti-espasmódicos, antiviróticos, auxiliares na recuperação do tecido da pele, cicatrizantes, desinfetantes, expectorantes e relaxantes (FRANCO, 2000). No entanto, apesar das características benéficas, os efeitos tóxicos destas substâncias não podem ser descartados, o que poderia levar de uma simples reação da pele aos efeitos convulsivos e psicotrópicos (ONOFRE et al., 2008).

A composição dos óleos essenciais é determinada geneticamente e em geral é

específica para um determinado órgão produtor. Dentre os fatores que podem influenciar na composição química do óleo essencial estão a sazonalidade, o ciclo de crescimento vegetativo, a disponibilidade hídrica, a radiação ultravioleta, os nutrientes do solo, a altitude, a poluição atmosférica, a indução por estímulos mecânicos e o ataque de patógenos, além da localização geográfica, tempo de colheita e o processo de obtenção do óleo (SIMÕES et al., 2007; GOBBO-NETO; LOPES, 2007; ONOFRE et al., 2008).

Adicionalmente, o ambiente em que o vegetal se desenvolve e o tipo de cultivo influem na composição química dos óleos essenciais. A temperatura, a umidade relativa, a duração total de exposição ao sol e o regime de ventos exercem influência direta, principalmente nas espécies que possuem estruturas histológicas de estocagem de óleo na superfície. Por outro lado, nos vegetais em que a localização de tais estruturas é mais profunda, a qualidade dos óleos é mais constante (VALBORMIDA et al., 2006).

Atualmente, já foram identificados cerca de 2000 compostos ativos presentes em óleos essenciais. Sua maioria é constituída de derivados fenilpropanóides e terpenóides, preponderando este último. Na mistura, os compostos apresentam-se em diferentes concentrações e normalmente, um deles é o composto majoritário, existindo outros em menores teores e alguns em baixíssimas quantidades (traços) (PICHESKY; NOEL; DUDAREVA., 2006; BAKKALI, et al., 2008).

Os fenilpropanóides são caracterizados por apresentarem um anel benzênico com uma cadeia lateral de três carbonos (Figura 1-A). São formados pela rota do ácido chiquímico, dando origem à fenilalanina e à tirosina, que pela ação da enzima fenilalanina amonialiase (PAL), perde uma molécula de amônia, originando o ácido cinâmico e p-cumárico que são os precursores da maioria dos compostos classificados como fenilpropanóides (ROBBERS et al., 1997; SIMÕES et al., 2007).



Figura 1 – Representação básica de um fenilpropanóide (A) e isopreno (B)

Os terpenóides são formados pela condensação de duas ou mais unidades de isopreno (2-metil-1,3-butadieno) (Figura 1-B); dessa forma, esses últimos são classificados pelo número de unidades isoprênicas que possuem, sendo mais freqüentes os monoterpenóides

(cerca de 90% dos óleos) e os sesquiterpenos (Tabela 1) (TAIZ; ZEIGER, 2004; SIMÕES; SPITZER, 2004). São sintetizados via mevalonato, o qual é formado pela condensação aldólica de duas unidades da acetoacetil-CoA, seguida de uma hidrólise, originando a 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). Esse sofre uma reação de redução catalizada pela enzima HMGCóA-redutase à mevalonato. O mevalonato é, então, convertido em isopentil-pirofosfato (IPP) ou isopreno ativo.

Tabela 1 – Condensação de unidades de isoprenos na formação de terpenóides

N Unidades	N átomos de C	Fórmula Molecular	Esqueleto	Nome ou classe
1	5	C ₅ H ₁₀		Isopreno
2	10	C ₁₀ H ₁₆		Monoterpeno
3	15	C ₁₅ H ₂₄		Sesquiterpeno
4	20	C ₂₀ H ₃₂		Diterpenos
5	25	C ₂₅ H ₄₀		Sesterpenos
6	30	C ₃₀ H ₄₈		Triterpenos
8	40	C ₄₀ H ₆₄		Tetraterpenos
N	N	C _{5n} H _{8n}		Polisoprenos

Fonte: Adaptado de Simões (2004)

Os óleos essenciais podem ser obtidos através de diferentes processos, dependendo da localização no vegetal, da quantidade e das características requeridas para o produto final. As técnicas usuais são a prensagem ou expressão, no caso de matérias primas ricas em óleo volátil e quando estão em tecidos periféricos, como em casca de citros; extração com solvente orgânico ou com gorduras (“enfleurage” ou enfloração), para matérias-primas delicadas como pétalas de flores; extração com fluido supercrítico (EFS), no caso de interesse em determinada fração de óleo; e destilação por arraste de vapor, para substâncias termoresistentes (ARIDOGAN et al., 2002; PRABUSEENIVASAN; JAYAKUMAR; IGNACIMUTHU, 2006).

A destilação por arraste de vapor de água é o método mais comumente utilizado a nível industrial e se caracteriza pela sua extrema simplicidade: o material a ser extraído é colocado em um recipiente através do qual se faz passar uma corrente de vapor de água, com ou sem pressão. Como os óleos essenciais têm pressão de vapor mais elevada que a água acaba sendo arrastados pelo vapor de água e a mistura de vapores é conduzida a um condensador, onde os compostos são recolhidos em um separador (RODRIGUES, 2002). No entanto, devido à labilidade dos constituintes de óleos voláteis, a composição dos produtos de extração por vapor d'água pode diferir da mistura inicial do constituinte. Durante o processo de aquecimento, a acidez e a temperatura podem provocar hidrólise dos ésteres, rearranjos, isomerização, racemização e oxidação, com perdas significativas nos valores de tais substâncias (DORES et al., 2006).

Em escala laboratorial, a hidrodestilação é o método mais utilizado. A extração ocorre em aparelho denominado Clevenger e consiste em submergir o material vegetal diretamente na água, onde após a ebulição os compostos voláteis existentes são carregados até o condensador, onde são resfriados e separados na água. (MECHKOVSKI; AKERELE, 1992).

Neste método pode-se medir o volume do óleo destilado e facilmente calcular o conteúdo, expresso em teor de óleo essencial (%v/m). Sua maior importância reside no fato de que as informações obtidas no processo servem de base para o desenvolvimento do processo industrial de destilação por arraste a vapor. Por outro lado, essa metodologia pode proporcionar degradação de alguns compostos presentes no óleo essencial, visto que a matéria prima permanece em contato com a água à elevada temperatura por longo período de tempo (SERAFINI et al., 2002).

2.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais é clara, mas os mecanismos de ação ainda não estão completamente elucidados (FISHER; PHILLIPS, 2008). Considerando o número de diferentes grupos de compostos químicos presentes nos óleos essenciais, é muito provável que a sua atividade antimicrobiana não seja atribuível a um mecanismo específico, mas que existam vários alvos na célula (BURT, 2004).

Segundo Lambert et al. (2001), na composição dos óleos essenciais há compostos que apresentam maior atividade antimicrobiana, sendo que a mistura de dois ou mais

compostos em quantidades adequadas, podem apresentar atividade antimicrobiana sobre as bactérias mais resistentes. Estudos demonstram que a composição, estrutura, bem como os grupos funcionais dos óleos essenciais estão diretamente envolvidos na atividade antimicrobiana, sendo os componentes com estruturas fenólicas e terpenoides os mais efetivos (DORMAN; DEANS, 2002; BEN ARFA et al., 2006).

Uma importante característica dos óleos essenciais é sua hidrofobicidade, fato este que permite a partição dos lipídios da membrana celular bacteriana perturbando sua estrutura e sua função. O efluxo de K^+ geralmente é o primeiro sinal de dano e, muitas vezes, é seguido pelo extravasamento de constituintes citoplasmáticos incluindo ATP. A perda da permeabilidade diferencial da membrana citoplasmática é considerada a causa da morte celular (BURT, 2004; BEN ARFA et al., 2006). Outro sítio de ação dos óleos essenciais é a parede celular, pois esses compostos podem acumular-se na parede e causar seu rompimento, e a inativação de algumas enzimas (DORMAN; DEANS, 2002).

Cristani et al., (2007) afirmam que a interação membrana-composto é um fenômeno dinâmico, bilateralmente controlado não só pela estrutura do componente químico mas também pela organização da membrana, a qual pode ser afetada pela internalização e absorção do composto na interface membrana-água e, por sua vez, podem ser modificadas como consequência da incorporação desses compostos na estrutura da membrana.

Demais eventos que poderiam levar à disfunção da célula microbiana são a inativação do mecanismo enzimático mitocondrial, inibindo o transporte de elétrons para produção de energia, interrompendo a força motriz de prótons, a translocação protéica e a síntese de componentes celulares e danos ao DNA, influenciando na síntese de material genético (ULTEE; BENNINK; MOEZELAR, 2002; SANTIESTEBAN-LÓPEZ; PALOU; LÓPEZ-MALO, 2007).

Cox et al. (2000) mostraram que o óleo essencial, obtido de uma árvore produtora de chá que continha terpinen-4-ol (um monoterpene cíclico), inibiu a respiração oxidativa em *Echerichia coli*, *Staphylococcus aureus* e leveduras, em sua concentração mínima inibitória, além de causar danos à membrana e aumentar sua permeabilidade.

Souza et al. (2010), avaliando a influência do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. sobre a produção de enterotoxinas e da permeabilidade da membrana de *Staphylococcus aureus* observaram que a supressão da produção de enterotoxina ocorreu em concentrações subinibitória do óleo essencial (0,3 e 0,15 $\mu\text{L/mL}$) e a perda de íons de potássio ocorreu logo após a adição do óleo essencial. Paul et al. (2011) encontraram aumento na concentração de

ATP extracelular, liberação de constituintes celulares e íons de potássio após o tratamento com óleo essencial de *Trachyspermum Ami* (L.), nas concentrações inibitórias, contra *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Typhimurium*, *Enterobacter aerogens* e *Staphylococcus aureus*.

Turgis et al. (2009) ao avaliarem a ação do óleo essencial de mostarda na membrana celular de *Escherichia coli* O157: H7 e *Salmonella typhi*, verificaram que o óleo essencial de mostarda afetou a integridade da membrana de ambas bactérias e induziu uma diminuição da concentração de ATP intracelular.

Oussalah et al. (2007) determinaram a concentração mínima inibitória de um extenso grupo de óleos essenciais contra *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella Typhimurium* e *Listeria monocytogenes*. Dos 28 óleos testados, os extraídos de *Corydothymus capitatus*, *Cinnamomum cassia*, *C. verum*, *Satureja montana* e *Origanum heracleoticum* apresentaram maior atividade contra os quatro micro-organismos testados.

Embora haja exceções na literatura, tem sido constatado que a ação antimicrobiana dos óleos essenciais é, geralmente, mais efetiva contra bactérias Gram-positivas. Uma possível explicação para esta atividade pode estar relacionada à dificuldade dos óleos essenciais em difundir a membrana externa, pois existe uma barreira hidrofílica que impede a passagem de macromoléculas e combinações hidrofóbicas, embora não seja totalmente impermeável. Devido a isso, as bactérias Gram-negativas são relativamente resistentes a combinações de antibióticos hidrofóbicos e drogas tóxicas (KALEMBA; KUNICKA, 2003; BAGAMBOULA et al., 2004).

Entre as bactérias Gram-positivas geralmente sensíveis, as bactérias ácido-láticas são mais resistentes. Sua habilidade de gerar ATP, pela sua fosforilação em nível de substrato, contribui para esta resistência (GILL et al., 2003). A maior capacidade de superar condições de stress osmótico e responder mais efetivamente ao efluxo de K^+ causado por estes agentes antimicrobianos, também exerce influência (HOLLEY; PATEL, 2003). Dentre as bactérias Gram-negativas, as do gênero *Pseudomonas* sp., são as que apresentam maior resistência a agentes antimicrobianos naturais (CAREAGA et al., 2003).

Pelissari, Pietro e Moreira (2010) analisaram a atividade antibacteriana do óleo essencial obtido a partir de partes aéreas de *M. divaricatum* contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella sonnei* e *Serratia marcescens*. Os resultados obtidos mostraram que apenas as espécies Gram-positivas (*S. aureus* e *B. subtilis*) foram sensíveis ao óleo essencial, e as demais espécies testadas não tiveram seu crescimento inibido.

Mendonça, Onofre e Sideney (2009) avaliaram a atividade antimicrobiana do óleo da resina de *Copaifera multijuga*, frente às linhagens *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os resultados mostraram que o óleo possui capacidade de inibir o crescimento das três bactérias avaliadas.

2.5 ÓLEOS ESSENCIAIS EM ALIMENTOS

O uso excessivo de conservantes químicos, questionado em virtude de seu potencial carcinogênico, atributos teratogênicos e toxicidade residual, tem levado a um aumento da pressão sobre os fabricantes de alimentos para substituição destes agentes por técnicas alternativas de preservação classificadas como naturais. Conseqüentemente, há um interesse considerável na pesquisa da possibilidade do uso de produtos naturais como óleos essenciais (FRIEDMAN; HENIKA; MANDRELL, 2002; KOTZEKIDOU, GIANNAKIDIS; BOULAMATIS, 2007).

Alguns autores relatam que os óleos essenciais apresentam duas principais e importantes características como agentes antimicrobianos para uso em sistemas de conservação de alimentos: sua origem natural, o que significa mais segurança para os consumidores e para o meio ambiente; e são considerados como possuidores de baixo risco de desenvolvimento de resistência microbiana. A segunda característica citada toma como base o fato de que os óleos essenciais são compostos por uma grande variedade de constituintes, os quais, aparentemente, apresentam diferentes mecanismos de atividade antimicrobiana, tornando, desta forma, mais difícil uma possível adaptação dos micro-organismos frente a sua ação (DAFERERA et al., 2003; BURT, 2004; SOUZA et al., 2007).

De acordo com Sacchetti et al. (2005) e Oussalah (2007) o uso de óleos essenciais em alimentos vem ganhando importância por apresentarem componentes naturais evitando-se o uso de aditivos sintéticos, deteriorações, oxidações e o ataque de micro-organismos apresentando eficiência nas funções antioxidantes, antirradicais e antimicrobianas em alimentos.

No entanto, para aplicação de óleos essenciais em alimentos, o impacto sensorial deve ser considerado, visto que concentrações mais elevadas são necessárias para se obter o mesmo desempenho antimicrobiano de óleos essenciais *in vitro*, em ensaios com matrizes alimentares. Deste modo, se elevadas concentrações, são necessários, para atingir atividades

desejadas, níveis inaceitáveis de sabor e aroma inapropriados podem ser percebidos (GUTIERREZ; BARRY-RYAN; BOURKE, 2008).

Para Shelef (1983), a concentração de óleo essencial para inibir a atividade microbiana é de 1% a 5%, ao passo que, para fins culinários, utilizam-se de 0,5 a 1% de ervas e especiarias, o que não é suficiente para inibir. Portanto, a determinação do equilíbrio entre a concentração ideal que exerça, simultaneamente, efeito antimicrobiano e realçador de sabor e aroma dos alimentos é primordial para a utilização dos óleos essenciais, em substituição aos aditivos sintéticos para alimentos.

A utilização de óleos essenciais no controle de micro-organismos patogênicos e deterioradores em alimentos requer uma avaliação de sua eficácia nos vários tipos de alimentos e nas matrizes que simulem sua composição. Resultados de algumas pesquisas têm sugerido que a eficácia antimicrobiana dos óleos essenciais pode ser minimizada pela presença e interação de alguns constituintes das matrizes alimentares, em especial suas macromoléculas (DORMAN; DEANS, 2000). Assim, tem sido admitido que determinados componentes nutricionais, principalmente os lipídios e/ou proteínas, quando em altas concentrações, poderiam proteger as bactérias contra a ação dos óleos essenciais e, ao mesmo tempo, possibilitar uma reparação mais rápida das células injuriadas pela maior disponibilidade de nutrientes neste meio, quando comparada aos meios laboratoriais (OUSSALAH, 2006; GUTIERREZ; BARRY-RYAN; BOURKE, 2008).

Adicionalmente, outros fatores intrínsecos ao alimento, como conteúdo de sal, carboidrato e valor de pH também poderiam interferir em algum grau na ação destes agentes antimicrobianos (HOLLEY; PATEL, 2005). Burt (2004) admite também que alguns fatores extrínsecos ao alimento, como a temperatura do ambiente e/ou características fisiológicas particulares do micro-organismo alvo, poderiam afetar adversamente a eficácia antimicrobiana dos óleos essenciais.

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais tem sido amplamente estudada nas mais diversas matrizes alimentares, como salsichas (SINGH et al., 2003; BUSATTA et al., 2008), carnes (SOLOMAKOS et al., 2008; DJENANE et al., 2011), presunto (GILL et al., 2002), queijo (SMITH-PLAMER; STEWART; FYFE, 2001; MENON; GARG, 2001; MENDONÇA, 2004; ALARCÓN, 2007), iogurte (PENNEY et al., 2004; EVRENDILEK; BALASUBRAMANIAM, 2011), alface (WAN, 1998; GUNDUZ; GONUL; KARAPINAR, 2010), cenoura (SINGH et al., 2002), chocolates (KOTZEKIDOU et al., 2007) e arroz (ULTEE et al., 2000).

Alguns autores têm proposto que resultados obtidos de ensaios em meios base de alimentos (caldo carne, caldo vegetais, caldo leite) e em sistemas alimentares, podem ser mais úteis como dados para posterior aplicação otimizada de óleos essenciais como conservantes em alimentos, quando comparados a resultados obtidos em meios laboratoriais (SMITH-PLAMER; STEWART; FYFE, 2001; GUTIERREZ; BARRY-RYAN; BOURKE, 2008).

Uma alternativa para minimizar os efeitos sensoriais negativos dos óleos essenciais em alimentos é a utilização da tecnologia de obstáculos ou barreiras que envolve técnicas de preservação múltiplas simultâneas e tem sido realizada, com sucesso, no controle de patógenos e na manutenção da qualidade dos alimentos durante o armazenamento (LEISTNER, 2000). Diversos sinergismos potenciais, entre componentes de óleos essenciais e conservantes ou métodos de conservação de alimentos têm sido sugeridos: baixo pH, baixa atividade de água, agentes quelantes, tensões de oxigênio reduzidas, tratamentos térmicos moderados e elevação de pressão. Para Brul, Coote (1999) e Santiesteban-López et al. (2007), estas combinações de tratamentos de conservação permitem que um nível exigido de proteção seja alcançado, ao mesmo tempo em que se retêm os atributos de qualidade organoléptica do alimento como cor, sabor, odor, textura e conteúdo nutricional.

Em 2008, Gutierrez et al. estudaram a atividade antimicrobiana de óleos essenciais derivados de ingredientes alimentícios, combinados e também as interações destes óleos essenciais com proteínas, carboidratos, lipídios e níveis de pH no alimento, a fim de otimizar a aplicação destes compostos em alimentos. Foram utilizados os óleos essenciais de manjeriço (*Ocimum basiculum L.*), manjerona (*Origanum majorana*), orégano (*Origanum vulgare*), alecrim (*Lippia sidoides*) e tomilho (*Thymus vulgaris*). De acordo com esse estudo a combinação de óleos essenciais pode reduzir as concentrações aplicadas e, conseqüentemente, minimizar qualquer efeito sensorial adverso no alimento. Os resultados também revelaram que os óleos essenciais podem ser mais eficientes contra bactérias patogênicas e formadoras de esporos, quando aplicados em alimentos com alto grau de proteína e pH ácido, assim como baixos níveis de lipídios e carboidratos.

O sabor, odor e cor de carne picada, contendo 1% de óleo essencial de orégano, foram afetados, positivamente, durante a estocagem, sob atmosfera modificada e vácuo a 5 °C. As alterações foram, praticamente, imperceptíveis após o cozimento (SKANDAMIS; NICHAS, 2001). Óleos de tomilho e orégano, distribuídos na superfície de *Robalo asiático* (0,05%), imprimiram um odor de ervas que, durante o armazenamento por 33 dias/0-2 °C, tornou-se mais pronunciado (HARPAZ et al., 2003). Ouattara et al. (2001) avaliaram os aspectos sensoriais de aparência, odor e sabor de camarões irradiados e tratados com óleo

essencial de tomilho. Os aspectos sensoriais não foram afetados pela irradiação e adição do óleo a 0,9%, no entanto, a adição de óleo essencial de tomilho 1,8% resultou em redução da aceitabilidade.

Govaris et al. (2010) avaliaram o efeito antimicrobiano do óleo essencial de orégano (0,6 e 0,9%), nisina (500 e 1000 UI) e suas combinações contra *Salmonella* Enteritidis em carne de cordeiro durante o armazenamento a 4 °C por 12 dias. Os autores encontraram uma forte atividade antimicrobiana quando se utilizou a combinação do óleo essencial (0,6%) com a nisina (500 UI), além disso a avaliação sensorial mostrou que a adição do óleo essencial de orégano em 0,6 ou 0,9% em carne de carneiro picada foi organolepticamente aceitável.

2.6 CONSIDERAÇÃO SOBRE AS BACTÉRIAS TESTADAS

2.6.1 *Aeromonas hydrophila*

O gênero *Aeromonas* sofreu inúmeras revisões taxonômicas nos últimos anos. Embora inicialmente localizado como um gênero da família *Vibrionaceae*, investigações filogenéticas indicaram que o gênero *Aeromonas* não está estreitamente relacionado a essa família. Atualmente, localizado em família própria, *Aeromonadaceae*, o gênero *Aeromonas* é composto por 24 espécies descritas por meio de características bioquímicas e grupos de hibridização de DNA (UEHARA, 2008; BEAZ-HIDALGO et al., 2009; FIGUERAS et al., 2010).

Dentre as espécies, *Aeromonas hydrophila* é a que mais preocupa em termos de patogenicidade. Recentes trabalhos vêm enfatizando sua emergência no cenário epidemiológico mundial, pois esta espécie vem sendo relatada como agente etiológico de uma variedade de infecções, incluindo as gastroenterites (UEHARA, 2008; DASKALOV, 2006).

A. hydrophila se caracteriza como espécie Gram-negativa, anaeróbica facultativa, não formadora de esporos, móvel, catalase positiva, oxidase positiva e fermentadora de carboidratos como glicose, frutose, maltose e trealose com produção de ácidos e gás (ISONHOOD; DRAKE, 2002; LUCENA, 2007).

São micro-organismos que apresentam 28 °C como temperatura ótima para seu crescimento, no entanto, são capazes de se desenvolver nas temperaturas empregadas na

conservação de alimentos, como 4 e 7 °C (MARCHAND et al., 2007). *A. hydrophila* revela ser bastante sensível quando submetido a pH abaixo de 5,5, no entanto, apresentam tolerância à salinidade (DELAMARE et al., 2000), o que lhes confere o potencial de manter elevada viabilidade ou mesmo, crescer em concentrações salinas comumente utilizadas na conservação de produtos alimentícios de origem animal e vegetal (LUCENA, 2007). A presença de O₂ exerce pouca influência sob o seu crescimento, tendo este micro-organismo já sido isolado de alimentos embalados à vácuo (ISONHOOD; DRAKE, 2002).

A. hydrophila apresenta distribuição ubíqua no ambiente, podendo ser isoladas, com variável frequência, de diferentes alimentos de origem animal, ocorrendo principalmente em peixes e frutos do mar como ostras, camarões, além de peixes defumados, de carne bovina, suína, ovina, aves, produtos cárneos como presunto, rãs, ovos, leite cru, pasteurizado e derivados como queijos, iogurtes, sorvetes e manteiga, bem como de vegetais como alface e outras saladas leves (DASKALOV, 2006; PALÚ et al., 2006).

Estudos comprovaram que as *Aeromonas* podem atuar como organismos infecciosos ou enterotoxigênicos, bem como patógenos oportunistas ou primários, resultando em sérias conseqüências para o ser humano (ISONHOOD; DRAKE, 2002).

Os principais fatores de virulência produzidos por *A. hydrophila*, já elucidados, são exotoxinas, citotoxinas, endotoxinas, siderofóros, invasinas, adesinas, camada – S e flagelos (DASKALOV, 2006).

Algumas estirpes de *A. hydrophila* apresentam a capacidade de invadir células epiteliais, desencadeando uma série de afecções, revelando-se de grande importância para a saúde pública (COSTA; ROSSI JÚNIOR, 2002), sendo a gastroenterite a infecção mais comum (PALÚ et al., 2006).

Segundo Kirov (1993), para que haja o quadro de gastroenterite deve haver a combinação de estirpes produtoras de fatores de virulência com condições predisponentes, como a idade e o estado imunológico do hospedeiro. Assim, a população mais propensa é aquela composta de pessoas imunocomprometidas, crianças com menos de dois anos e adultos com mais de 50 anos (PEREIRA et al., 2004).

Os sintomas se manifestam geralmente no período de 22 a 34 horas após a ingestão do alimento, caracterizando-se por náuseas, vômito, dor muscular e diarreia (DASKALOV, 2006). *A. hydrophila* pode causar também doenças graves como osteomielite, septicemia, meningite, endocardite, infecções cutâneas, úlceras de córnea, peritonites e pneumonias (SOLER et al., 2004, UEHARA, 2008; HAYES et al., 2007).

O consumo de água e/ou alimentos contaminados, assim como o contato direto da água com feridas e lesões na pele são consideradas classicamente as vias de transmissão das infecções cutâneas e gastrintestinais por *Aeromonas* (CASTRO-ESCARPULLI et al., 2003). Kirov (1993) e Krovacek et al., (1995) consideram que as *Aeromonas* podem chegar até os alimentos pela água contaminada, fezes de animais que alberguem as bactérias, ou ainda por pessoas portadoras ou doentes que manipulem alimentos.

A presença de *A. hydrophila*, na cadeia de leite e seus derivados, vêm sendo documentada. Para Khalil (1997), o leite pode ser facilmente contaminado por estes micro-organismos em decorrência da colonização da glândula mamária, onde se multiplicam e conseqüentemente são descarregados juntamente com o leite. Freitas (1993) afirma que, para os derivados lácteos, a contaminação decorre da presença do agente na matéria prima utilizada para produção ou devido a condições higiênicas insatisfatórias durante o processamento. A conservação pelo frio também permite o aumento da população, visto a sua capacidade de multiplicação sob refrigeração.

Bulhões e Rossi Junior (2002), ao estudarem a prevalência deste micro-organismo no queijo minas frescal artesanal, detectaram sua presença em 51,2% das amostras (82/160), em quantidades que variaram entre $5,0 \times 10^3$ e $4,0 \times 10^5$ UFC/g. Segundo estes autores, as precárias condições de higiene no setor primário e o possível uso de água não tratada seriam pontos críticos à sua inserção na cadeia produtiva.

Freitas et al. (1993) após analisarem 35 amostras de leite pasteurizado e 25 de queijo frescal, comercializados em supermercados do Rio de Janeiro, detectaram a presença de *A. hydrophila* em 12,8% destes produtos.

2.5.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, é um bacilo Gram-negativo, anaeróbio facultativo, não esporulado que fermenta a glicose com formação de ácido e gás (LEVINE et al., 1987).

E. coli pode crescer em ambientes com pH entre 4,4 e 9, porém, é conhecida sua capacidade de tolerar ambientes ácidos, que lhe permitem sobreviver no trato gastrintestinal. A temperatura de crescimento varia entre 7° a 48 °C, sendo 37 °C a temperatura ótima. No entanto, diversos autores têm observado crescimento em alimentos de algumas cepas de *E.*

coli a temperaturas menores, como 4 °C, por vários dias (ANANG et al., 2007; GONZÁLEZ-MONTALVO et al., 2007). Apresenta condições ótimas de Aa (atividade de água) de 0,95 e sua resistência à salinidade segue até 8% de NaCl (HIRAMATSU et al., 2005).

Este micro-organismo faz parte da microbiota no trato gastrointestinal do homem e de diferentes espécies de animais domésticos e selvagens (CAPRIOLI et al., 2005), e é bastante encontrado em diversos alimentos, tais como salames, leite cru, queijos, sucos não pasteurizados, melão e vegetais (GYLES, 2007; KARMALI; GANNON; SARGEANT, 2009).

E. coli inicialmente foi usada para indicar a contaminação da água por material fecal e, conseqüentemente, alertar a presença potencial de patógenos entéricos. Da água foram estendidos aos alimentos, sem uma avaliação muito criteriosa da validade dessa aplicação em diferentes produtos. Atualmente, a premissa de que altos números de *E. coli*, coliformes termotolerantes, coliformes totais ou enterobactérias em alimentos estão correlacionados com contaminação fecal já não é válida, por uma série de razões: 1) Esses organismos não são habitantes obrigatórios do trato gastrointestinal de animais de sangue quente, e podem ser encontrados em reservatórios ambientais; 2) São comuns nos ambientes de manufatura de alimentos, e podem tornar-se parte da microbiota residente, principalmente se as condições de limpeza são inadequadas; 3) Várias estirpes de *E. coli*, coliformes ou enterobactérias podem crescer em alimentos refrigerados (DOWNES; ITO, 2001).

As principais aplicações desses micro-organismos como indicadores, na verdade são: 1) indicadores das condições de higiene dos processos de fabricação, porque são facilmente inativados pelos sanitizantes e capazes de colonizar vários nichos das plantas de processamento, quando a sanitização é falha; 2) indicadores de falha do controle de contaminação pós-processo em alimentos pasteurizados, porque são facilmente destruídos pelo calor e não devem sobreviver ao tratamento térmico e 3) *E. coli* pode ser usada como indicador fecal em alimentos “in natura” (DOWNES; ITO, 2001).

Em função das manifestações clínicas, fatores de virulência e mecanismos pelos quais causam a doença, os subgrupos de *Escherichia coli* diarreio gênicos podem ser subdivididos em seis patotipos (Figura 3): *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* produtora de toxina de Shiga ou verotoxigênica (STEC ou VTEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* difusamente aderente (DAEC). Há também patotipos não causadores de diarreia, mas que causam infecções extra-intestinais (ExPEC) (RUSSO; JOHNSON, 2000), septicemia e meningite

(MNEC) e, infecções extra-intestinais em unidades de tratamento intensivo (UPEC) (CAPRIOLI et al., 2005; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Estirpes de ETEC é a principal causa de diarreia em crianças em processo de desmame e da “diarreia do viajante”. Os principais fatores de virulência das bactérias deste patótipo são as adesinas fimbriais, pois aderem e colonizam a mucosa do intestino delgado, e a produção de toxinas termolábil (LT) e termoestável (ST), sendo a primeira semelhante à toxina colérica (ZANG et al., 2006).

O patótipo EAEC forma um padrão agregativo de adesão em células HEP-2 ou HeLa. Provoca lesões caracterizadas por hiperplasia moderada do íleo e ceco, edema das vilosidades do intestino delgado e deposição de camadas de bactérias agregadas, empilhadas sobre o epitélio (TRABULSI et al., 2008).

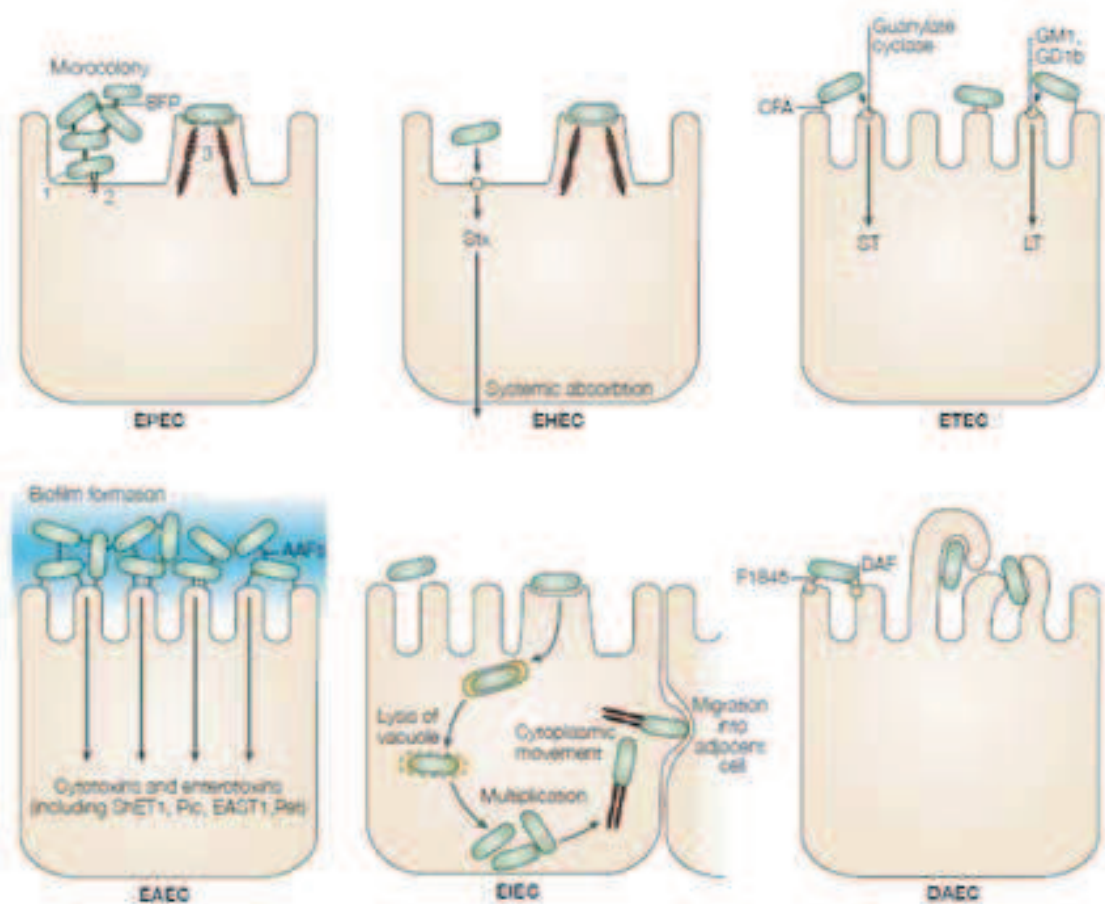


Figura 3. Interação dos seis patótipos de *Escherichia coli* diarreiogênicas com a célula alvo. Adaptado de Kaper et al., 2004.

Escherichia coli enteroinvasivas (EIEC) são patogênicas e sua virulência é devida à habilidade para invadir células epiteliais intestinais (SMITH et al., 2004). Após a invasão,

proliferam no interior dos enterócitos e destroem o epitélio do cólon, (GERMANO; GERMANO, 2008).

Estirpes de EPEC são a principal causa de diarreia infantil nos países em desenvolvimento. Essas linhagens causam uma lesão intestinal conhecida como A/E (*attaching and effacing*), caracterizada por destruição das microvilosidades das células epiteliais intestinais, pelo contato íntimo entre a bactéria e a membrana da célula hospedeira e na formação dos pedestais (TRABULSI et al., 2008).

O patótipo EHEC engloba linhagens que causam um tipo de diarreia sanguinolenta, denominado colite hemorrágica (HC), e a síndrome urêmica hemolítica (HUS). O principal fator de virulência desse patótipo é a toxina Stx, que inibe a síntese protéica (NAKANISHI et al., 2009).

As DAEC aderem em um padrão em que as bactérias são homoganeamente distribuídas sobre a superfície da célula hospedeira, denominado adesão difusa. São associadas mais frequentemente à diarreia persistente e sua presença é considerada fator de risco para quadro persistente (BARDHAN et al., 1998).

2.5.3 *Listeria monocytogenes*

O gênero *Listeria*, pertencente à família *Listeriaceae*, é dividido em seis espécies: *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Listeria seeligeri*, *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri* e *Listeria grayi*. A principal espécie patogênica ao homem e animais é *L. monocytogenes*, contudo *L. ivanovii* e *L. seeligeri* já foram relacionadas a alguns casos de infecção humana (VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001; JEMMI; STEPHAN, 2006;).

Treze sorotipos de *L. monocytogenes* capazes de causar infecção no homem já foram identificados, entretanto, somente três (1/2a, 1/2b e 4b) são associados com a maioria dos casos. O sorotipo 4b está envolvido em quase todos os surtos, sugerindo que as cepas desse sorotipo são mais adaptadas aos tecidos de mamíferos (SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007; VASILEV et al., 2009). No Brasil, os sorotipos predominantes são 4b e 1/2a (LEMES-MARQUES; CRUZ; DESTRO, 2007).

Listeria monocytogenes está amplamente distribuída na natureza podendo ser isolada do solo, água, silagem, plantas e outras fontes. Esta bactéria, mesmo não sendo esporulada, apresenta destacável resistência por suportar os efeitos deletérios do congelamento, tolerar

valores extremos de pH (5 – 9), baixa atividade de água, concentrações de NaCl superiores a 10 %, além de poder se desenvolver em ambientes com baixas tensões de oxigênio, devido à sua característica microaerófila, (BAYLES, 2004; FRÖDER, 2005).

Este micro-organismo vem recebendo uma atenção especial da comunidade científica nas últimas décadas, em virtude de sua habilidade em se desenvolver em temperaturas baixas, permitindo assim sua multiplicação em alimentos refrigerados (PAL; LABUZA; GONZALEZ, 2008). Assim, enquanto a refrigeração constitui obstáculo para a maioria dos patógenos, *L. monocytogenes* encontra nos alimentos armazenados sob refrigeração, um ambiente com baixa competição para multiplicação, fazendo destes, o substrato ideal para seu desenvolvimento (GANDHI; CHIKINDAS, 2007).

Alimentos tipicamente associados com contaminação por *L. monocytogenes* incluem produtos derivados do leite (queijos macios, leite não pasteurizado, etc), saladas preparadas, certos tipos de carne bovina, de ave e peixe (RIVOAL et al., 2010) e carne suína (FRÖDER, 2005). Os alimentos prontos para consumo, armazenamento sob refrigeração, com longa vida de prateleira e contaminação pós-processamento também são considerados como fontes de contaminação (SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007).

Nas indústrias alimentícias, um fator preocupante é a capacidade de *L. monocytogenes* formar biofilmes em superfícies inertes. Portanto, devido à sua capacidade em multiplicar-se em baixas temperaturas, freqüentemente encontradas nas plantas processadoras de alimentos de origem animal, aliado à sua capacidade de se adaptar às condições de estresse, a presença deste patógeno nas linhas de processamento, distribuição e estocagem de alimentos, torna seu controle um grande desafio para a indústria de alimentos. (JEMMI; STEPHAN, 2006; RAMASWAMY et al., 2007).

L. monocytogenes pode causar a listeriose, uma das mais severas infecções de origem alimentar, que tem baixa morbidade e alta mortalidade (até 50%). Em pessoas saudáveis, a infecção pode ser assintomática ou apresentar-se com sintomas semelhantes a uma gripe, acompanhados ou não de febre ou quadros gastroentéricos (LIANOU; SOFOS, 2007). Entretanto, esta bactéria pode causar aborto em mulheres grávidas e infecção no sistema nervoso central, bacteremia primária e septicemia nos recém-nascidos, crianças e adultos que estão imunossuprimidos (YU-SHIH et al., 2007).

Cada passo da infecção por *L. monocytogenes* requer a expressão de fatores de virulência específicos, dos quais vários já foram descritos, como as internalinas, listeriolisina O, fosfotidilinositol (PI-PLC), fosfotildicolina (PC-PLC), proteína act-A, proteína de ligação

da fibronectina, lecitinasas e proteases (JEMMI; STEPHAN, 2006; POSFAY-BARBE; WALD, 2009).

A dose mínima infectante de *L. monocytogenes* ainda não foi estabelecida (MARTINS; GERMANO, 2011), mas estima-se que varia de 10^2 a 10^9 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por grama do alimento ingerido, podendo ser mais baixa em indivíduos imunocomprometidos (JEMMI; STEPHAN, 2006).

Uma característica peculiar deste patógeno é o longo período de incubação, podendo levar semanas após a exposição para que a infecção se manifeste (GANDHI; CHIKINDAS, 2007) tornando-se um agravante ao diagnóstico e notificação desta enfermidade as autoridades de saúde.

A adoção, por parte de diversos países, de padrões microbiológicos exigindo a ausência de *L. monocytogenes* em alimentos, visa assegurar um produto isento de risco para o consumidor, pois, embora uma única célula deste micro-organismo, provavelmente, não seja suficiente para causar listeriose, sua capacidade de multiplicação durante a estocagem de alimentos, mesmo sob refrigeração, faz com que sua presença no alimento coloque em risco a saúde dos consumidores mais susceptíveis (CATÃO; CEBALLOS, 2001).

A conduta, com relação aos limites toleráveis de *L. monocytogenes* em alimentos difere entre os países. Nos Estados Unidos, Canadá e Dinamarca estabeleceu-se a chamada "Tolerância Zero", onde não é permitida a presença do patógeno em 25 gramas do alimento. Entretanto na maioria dos países europeus, o limite permitido é de até 100 UFC/g no alimento no momento do consumo (LIANOU; SOFOS, 2007; PRADHAN et al., 2010). A legislação brasileira, Resolução RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001 do Ministério da Saúde, determina a ausência de *L. monocytogenes* em 25 g somente em alguns tipos de queijo. Para outros alimentos, como produtos cárneos, não existe limite regulatório (BRASIL, 2001).

A literatura é abundante em relatos da presença de *Listeria* spp. em alimentos, seja nas matérias-primas, durante a produção e/ou o processamento, nos produtos já acabados e em linhas de processamento (DESTRO et al., 2000; PELISSER et al., 2001; JEMMI; STEPHAN, 2006; SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007; ARAGON-ALEGRO et al., 2008; DENNY; MCLAUHLIN, 2008; GOULET et al., 2008).

Barros et al. (2007) observaram uma ampla disseminação de *Listeria* spp. nas onze linhas de processamento de carne bovina e derivados estudadas, e em um abatedouro localizados no Estado do Paraná. *L. monocytogenes* foi encontrada nos equipamentos (9,2%), instalações (8,7%) e nos produtos finais (17,6%).

A ocorrência de *Listeria* spp em pontos críticos de controle e no ambiente de processamento de queijo Minas Frescal foi avaliada por Silva et al. (2003). Neste estudo foram identificados como pontos críticos para a produção deste queijo a recepção do leite cru, pasteurização, coagulação e armazenamento, sendo detectadas a presença de *L. monocytogenes* a partir do leite cru (16,7%) e do chão da sala do refrigerador de queijos (14,3%).

Listeria spp foi detectada em 11,8 % de em 93 amostras de queijo Minas Frescal coletadas em supermercados de Campinas/SP (CARVALHO et al., 2007). Feitosa et al., (2003) verificaram a qualidade higiênico-sanitária de amostras de queijo de coalho (11 amostras) e de queijo de manteiga (13 amostras) oriundos de seis microrregiões do Rio Grande do Norte e constataram que 9% e 15% destas, respectivamente, continham *Listeria* spp.

2.5.4 *Salmonella* Enteritidis

O gênero *Salmonella* é taxonomicamente dividido em duas espécies: *S. enterica* e *S. bongori* (BRENNER; KRIEG; STALEY, 2005). Em 2004, foi proposta a inclusão de uma terceira espécie denominada *S. subterranea* (SHELOBOLINA et al., 2004). Por sua vez, a espécie *Salmonella enterica* é dividida em seis subespécies, as quais apresentam diferenças bioquímicas e genômicas entre si: *S. enterica* subespécie *enterica* (I), *S. enterica* subespécie *salamae* (II), *S. enterica* subespécie *arizonae* (IIIa), *S. enterica* subespécie *diarizonae* (IIIb), *S. enterica* subespécie *houtenae* (IV) e *S. enterica* subespécie *indica* (VI) (BRENNER; KRIEG; STALEY, 2005).

Atualmente, são conhecidos 2579 sorovares, dos quais, 2.557 pertencem à *S. enterica* e 22 à *S. bongori*. Dentre os sorotipos presentes em *S. enterica*, 1.531 (59,87%) são da subespécie entérica, na qual estão incluídas os sorotipos Typhi, Enteritidis e Typhimurium (GRIMONT; WEILL, 2007). A sorotipagem é baseada no esquema de Kauffmann-White e consiste na caracterização dos antígenos somáticos (O) e flagelares (H) (BRENNER; KRIEG; STALEY, 2005).

Nas últimas décadas, a ocorrência de infecção por *Salmonella* sp. no homem, relacionados com a ingestão alimentos contaminados, teve um aumento significativo em vários países. O Centro de Controle de Doenças e Prevenção de Doenças (CDC) estima que 1

milhão de casos de salmonelose não-tifóide ocorrem a cada ano nos EUA, onde 27% dos pacientes requerem hospitalização, com uma taxa de mortalidade de 0,5% (SCALLAN et al., 2011).

Dentre os sorotipos, a Enteritidis, de acordo com os dados do CDC (2010), é a mais comumente isolada em surtos de infecção alimentar em seres humanos. Em 2006, o ano mais recente para o qual os dados são disponíveis, *S. Enteritidis* causou quase 17% dos casos notificados de salmonelose. A União Européia (UE) informou que *S. Enteritidis* foi responsável por 60% de todos os surtos verificados devido a *Salmonella* (EFSA, 2009). No Brasil, no Estado de São Paulo, no período de 1996 a 2003, o sorovar com maior prevalência em amostras clínicas foi *S. Enteritidis* seguido dos sorovares *S. Typhimurium*, *S. Agona* e *S. Typhi* (FERNANDES et al., 2006). Em alimentos, o sorovar mais freqüentemente isolado também é *S. Enteritidis* (TAVECHIO et al., 2002; MÜRMAN; SANTOS; CARDOSO, 2009).

Salmonella Enteritidis é um bacilo Gram-negativo, não formador de esporos, anaeróbio facultativo, móvel por flagelos peritríquios. Seu perfil bioquímico caracteriza-se por produção de ácido sulfídrico e gás carbônico a partir da glicose e outros carboidratos, exceto a lactose e a sacarose. Além disso, são oxidase e catalase positivas e capazes de se multiplicarem utilizando o citrato como única fonte de carbono (DICKEL, 2004; PLYM-FORSHELL; WIERUP, 2006).

A temperatura ótima de crescimento é de 37 °C, porém algumas cepas são capazes de se multiplicar em uma ampla faixa de temperatura 5,5 °C a 49,5 °C, podendo sobreviver em alimentos sob refrigeração e congelamento (RHOADES; DUFFY; KOUTSOUMANIS, 2009). Embora possa crescer em pH 5,2, o pH ótimo de crescimento é próximo da neutralidade, sendo considerados inativos em pH com valores acima de 9,0 e abaixo de 4,0 (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

S. Enteritidis têm ampla capacidade de disseminação, tendo como habitat primário o trato intestinal de mamíferos, anfíbios, répteis e aves. Tanto o homem como animais podem excretar esses micro-organismos, que podem sobreviver por longos períodos no ambiente (PLYM-FORSHELL; WIERUP, 2006). Além disso, salmonelas têm sido detectadas em uma grande variedade de alimentos, com maior incidência em produtos cárneos, ovos e produtos lácteos (ZHAO et al., 2008; SWITT et al., 2009).

A introdução deste patógeno na cadeia de produção de animais de criação pode ocorrer através de outros animais infectados, animais silvestres, água e ração, e sua permanência depende das condições ambientais. Nos animais abatidos, a contaminação de carcaças com

material intestinal/fecal é a principal causa de infecções humanas de origem alimentar (PLYM-FORSHELL; WIERUP, 2006).

A doença causada pela *Salmonella* Enteritidis no homem pode se apresentar como uma gastroenterite até uma septicemia, causando severo dano (CASTILLA et al., 2006). Existem relatos deste sorotipo envolvido em pericardite, osteomielite, abscesso cerebral e hepático (SARRIA et al., 2000; FERNANDES et al., 2006).

Em muitos casos, a *S. Enteritidis* determina uma doença auto-limitante, os sintomas iniciais da doença são náusea e vômito, que ocorrem de 8 a 24 horas após a ingestão do alimento contaminado e, geralmente, não persistem após o início da diarreia. A duração é, usualmente, de 4 a 7 dias e a maioria das pessoas se recupera sem tratamento (DOYLER; BEUCHAT, 2007). No entanto, em alguns indivíduos a diarreia pode ser tão severa que o paciente precisa ser hospitalizado. Nestes pacientes a infecção pode invadir a corrente sanguínea levando à septicemia e aumentando o risco de óbito, a não ser que o paciente seja tratado rapidamente com antibióticos. Idosos, crianças e aqueles com o sistema imune comprometido são mais suscetíveis à doença severa (HUGHES; GILLESPIE; O'BRIEN, 2007).

2.5.5 *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus*, pertencente à família *Micrococcaceae*, é formado atualmente por 42 espécies que são tradicionalmente divididas em dois grupos de acordo com a capacidade de produção da enzima coagulase: os estafilococos coagulase-positivo e estafilococos coagulase-negativo. Pertencente ao primeiro grupo, o *Staphylococcus aureus* é considerado o mais importante por possuir inúmeros fatores de virulência, patogenicidade e ocorrer com alta frequência em surtos de origem alimentar (LOWY, 2003; VASCONCELOS; CUNHA, 2010).

Staphylococcus aureus são cocos Gram-positivos, imóveis, anaeróbios facultativos, apresentando metabolismo fermentativo com produção de ácido, não fotossintético, não esporulado e catalase positivos (JAY, 2005; VASCONCELOS; CUNHA, 2010).

Mesmo sendo micro-organismos mesófilos, podem crescer e se multiplicar numa ampla faixa de temperaturas, tendo seu limite mínimo e máximo de 7 °C e 47,8 °C, respectivamente, sendo 30 a 37 °C a faixa de temperatura ótima para o seu crescimento

(CUNHA NETO; SILVA; STAMFORD, 2002; QUINN et al., 2005). Algumas linhagens podem tolerar concentrações de até 20 % de cloreto de sódio e se manter viáveis, sob condições ideais, em valores de Aa de 0,83, entretanto, requerem um valor mínimo de 0,86 para o seu crescimento (JAY, 2005; WIJNKER et al., 2006).

S. aureus possui uma distribuição ubiqüitária, sendo seu reservatório primário a pele e membranas mucosas, especialmente a região naso-faríngea de humanos e animais (FUEYO et al., 2005). Os seres humanos, neste caso, funcionam como portadores deste micro-organismo, transmitindo-os a outras pessoas e aos alimentos que porventura possam estar produzindo ou manipulando, em indústrias e redes de distribuição e de serviços de alimentação (LE LOIR et al., 2003). Lues e Van Tonder (2007) encontraram uma incidência de 88% das amostras, ao investigar a presença de *S. aureus* nas mãos de manipuladores de alimentos. Este fato é preocupante, já que este micro-organismo é reconhecido como um importante agente patogênico, por sua capacidade de produzir toxinfecções alimentares (JORGENSEN et al., 2005).

Além do mais, quando presentes em tecidos ou secreções glandulares (leite) de animais, podendo ou não estar provocando mastites clínicas ou subclínicas (TROVÓ; LEMOS; GIVISIEZI., 2005), há a possibilidade de transmissão deste agente por via alimentar, especialmente quando este resistir a processos de transformação dos tecidos oriundos destes animais em alimentos. Isto é muitas vezes possível, pois *S. aureus* é bastante resistente a alguns processos que são utilizados em indústrias para destruição ou controle do crescimento de micro-organismos, como a salga e a desidratação (BOYNUKARA et al., 2008).

A patogenicidade de *S. aureus* é multifatorial, geralmente envolve um grande número de proteínas extracelulares e outros fatores de virulência. Algumas destas proteínas, incluindo citotoxinas e exoenzimas, são secretadas; outras, incluindo a proteína A e várias adesinas, fixam-se na parede celular. Juntas, estas proteínas capacitam o micro-organismo a escapar das defesas do hospedeiro, aderir às células e moléculas da matriz intercelular, invadir ou destruir as células do hospedeiro, e a se propagar dentro dos tecidos (VOJTOV; ROSS; NOVICK, 2002). Além disso, algumas cepas de *S. aureus* secretam três tipos de toxinas com atividade super-antigênica, a citar enterotoxinas estafilocócicas, toxinas da síndrome do choque tóxico (TSCT-1) e toxinas esfoliativas (A e B) (CARSON; MEE; RILEY, 2002; NOSTRO et al., 2004).

Até o momento foram identificadas 23 enterotoxinas estafilocócicas (SE), denominadas SEA, SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEIJ, SEIK, SEIL,

SEIM, SEIN, SEIO, SEIP, SEIQ, SER, SES, SET, SEIU e SEIV (VASCONCELOS; CUNHA, 2010). As enterotoxinas SEA, SEB, SEC, SED e SEE são consideradas clássicas por estarem 95% das vezes relacionadas com os surtos de enfermidades transmitidas por alimentos e por sempre possuírem capacidade emética (AKINEDEN et al., 2008).

Em sua forma biologicamente ativa, as SE são altamente resistentes ao calor, permanecendo ativas em altas temperaturas, conseguindo ficar em média de 3 a 8 minutos a 121 °C e não são inativadas por enzimas proteolíticas, motivo pelo qual permanecem ativas mesmo após a ingestão, não sendo afetadas por enzimas de outros micro-organismos ou do próprio alimento (SILVA; GRANDA, 2004; VASCONCELOS; CUNHA, 2010). Portanto, dadas estas características, a prevenção deve ser feita antes que o micro-organismo tenha condições de produzi-la, pois, uma vez no alimento, sua eliminação é muito difícil.

Borges et al. (2008), referem que dos surtos provocados por doenças microbianas transmitidas por alimentos, a intoxicação estafilocócica é relatada como a causa mais freqüente em muitos países, sendo a freqüência destes surtos favorecida em decorrência das características ubiqüitárias do *S. aureus*, que o torna amplamente disseminado nos ambientes de circulação do ser humano.

A intoxicação alimentar estafilocócica é causada através da ingestão das toxinas pré-formadas nos alimentos. Seus sintomas incluem náusea, grande quantidade de vômito, alteração de pressão arterial, cólicas abdominais e diarreia. Tais sintomas costumam se apresentar de 2 a 8 horas após o consumo do alimento contaminado e são agudos e rápidos o suficiente para levar a uma internação hospitalar, mas, em geral, auto-limitados (PANNEERSEELAN; MURIANA, 2009; SILA; SAUER; KOLAR., 2009).

Estudos têm demonstrado que a quantidade de enterotoxina requerida para produzir a intoxicação alimentar estafilocócica depende da suscetibilidade individual à toxina, do peso e do estado geral de saúde da pessoa afetada (SORIANO et al., 2002). Entretanto, não existe consenso na literatura sobre a dose infectante da enterotoxina capaz de produzir os sintomas da intoxicação alimentar em seres humanos.

A intoxicação alimentar estafilocócica é raramente registrada e por essa razão existe informações limitadas sobre a prevalência de tipos de enterotoxinas ou seu caráter endêmico e/ou epidêmico (MARTIN et al., 2004). Sua notificação não é considerada compulsória no Brasil e em diversos países desconhecendo-se a verdadeira incidência devido à sintomatologia geralmente branda e de curta duração, uma vez que apenas grandes surtos chegam ao conhecimento das autoridades sanitárias (FRAZIER; WESTHOFF, 2000).

2.6 MATRIZ ALIMENTAR: QUEIJO MINAS FRESCAL

O queijo minas frescal é um dos derivados lácteos de origem brasileira mais apreciados, sendo produzido nos mais diversos estados, tendo sua fabricação iniciada no século XVIII em Minas Gerais (CAMPOS, 2001). É um dos queijos mais populares do Brasil, sendo consumido por todas as camadas da população durante o ano todo (FURTADO, 2005). Existem no Brasil cerca de 72 tipos de queijos, dentre os quais o queijo minas frescal é o terceiro mais consumido, representando 9% da produção nacional, perdendo apenas para os queijos Mussarela, 33% e o Prato, 24% (BURITI; ROCHA; SAAD, 2005).

Segundo a Portaria n^o 352 do Ministério da Agricultura e do Abastecimento (BRASIL, 1997), o queijo minas frescal é um queijo fresco obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não com ação de bactérias lácticas específicas. É classificado como queijo semigordo de alta umidade a ser consumido fresco, de consistência branda e macia, com ou sem olhaduras mecânicas, de cor esbranquiçada, de sabor suave a levemente ácido, sem ou com crosta fina e de forma cilíndrica.

O queijo minas frescal é produzido em fábricas de pequeno, médio e grande porte, possuindo um processo de fabricação simples, com utilização de equipamentos tradicionais. A importância deste tipo de queijo no mercado brasileiro está relacionada ao alto rendimento, custo do produto final baixo, simplicidade no processo de fabricação e preço acessível, o que torna o produto atraente para as indústrias queijeiras (FURTADO, 2005).

O queijo minas frescal por ser um produto de massa crua, com alto teor de umidade (46-55%) e não maturado, deve ser consumido nos primeiros quinze dias após sua fabricação, sendo, portanto, um produto altamente perecível, mesmo sob refrigeração (SILVA et al., 2003; BURITI; ROCHA; SAAD, 2005).

Por ser um alimento rico em nutrientes, o queijo minas frescal, constitui um substrato propício para a multiplicação microbiana inclusive de patógenos como *S. aureus*, *Salmonella* sp. e *L. monocytogenes* que estão envolvidos em diversos casos de doenças associados ao consumo de alimentos (NOGUEIRA; LUBACHEVSKY; RANKIN, 2005).

O queijo minas apresenta vários pontos críticos durante a fabricação que podem conduzir as alterações no produto final, dentre eles destaca-se a alta contaminação microbiológica da matéria-prima, recontaminação do leite pós-pasteurizado, temperaturas inadequadas de fabricação e armazenamento (FREO; REOLON, 2006).

De acordo com os Padrões Microbiológicos vigentes, da RDC n^o12 (BRASIL, 2001) os queijos de muito alta umidade (>55%), como o minas frescal, deve apresentar as seguintes tolerâncias máxima para amostras indicativas: 5×10^2 Número Mais Provável (NMP) de coliformes a 45 °C/g, 5×10^2 Unidade Formadora de Colônias (UFC) de estafilococos coagulase positiva/g, e ainda ausência de *Salmonella* sp. e *Listeria* sp. em 25g.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Análise de Matérias Primas Agropecuária e Laboratório de Microbiologia do Centro de Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) Campus Patos, e no Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Laboratório de Tecnologia de Cereais e Panificação do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) Campus I.

3.1 EXTRAÇÃO E ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL

3.1.1 Coleta e identificação do material

A matéria prima utilizada no desenvolvimento experimental deste trabalho consistiu de folhas da caatinga branca (*Croton rhamnifolioides*) coletadas aleatoriamente de plantas da zona rural do município de Sumé – PB (7°40'S: 36°52'O, altitude a nível do mar de 532m), situada na mesorregião do cariri paraibano. As coletas foram realizadas nos período de agosto a setembro de 2010.

A classificação botânica da planta coletada foi confirmada pela equipe funcional do Herbário da Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas do CSTR/UFCG, onde exsicata com número de registro 691 encontra-se depositada.

3.1.2 Extração do óleo essencial

O óleo essencial das folhas frescas de *C. rhamnifolioides* foi obtido pelo processo de hidrodestilação utilizando o aparelho extrator Clevenger, por um período de duas horas (FARMACOPÉIA, 1997). Em um balão de três litros, 150 g de folhas frescas foram colocadas e adicionado água destilada até imersão do mesmo, tendo em seguida iniciado o processo de extração através do arraste do óleo essencial pelo vapor de água aquecida através de manta aquecedora elétrica. Em seguida, a fração de óleo essencial extraída foi tratada com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) para retirar o excesso de água e armazenado em recipiente de vidro âmbar hermeticamente fechado, em temperatura de refrigeração, por um período de

seis meses (MATOS et al., 1999).

O cálculo do rendimento foi realizado através da relação do volume de óleo essencial obtido com a massa de material vegetal utilizado na extração. O resultado foi expresso em porcentagem (v/p) (CRAVEIRO et al., 1989).

3.1.3 Análise cromatográfica (CG/MS)

A análise da composição química do óleo essencial foi realizada usando um sistema cromatografia gasosa acoplado a espectro de massa (CG/EM), em aparelho SHIMADZU com detector seletivo de massa QP2010A, operando sob energia de ionização de 70 eV. A coluna de capilaridade utilizada foi OV (30 m x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 mm filme); nas seguintes especificações: temperaturas de 230 °C no injetor e 290 °C no detector, tendo hélio como gás de arraste (1,0 mL/min); velocidade linear de 47,3 cm/s; fluxo total de 24 mL/min; fluxo de portador de 24 mL/min; pressão de 107,8 kPa; e a temperatura de aquecimento da coluna foi programada para 60 °C (2 min) - 180 °C (1 min) a 4 °C/min e de 180 - 260 °C a 10 °C/min (10 min). A identificação dos componentes foi realizada por comparação entre seu respectivo espectro de massa com aqueles padrões registrados na base de dados da biblioteca Wiley 229 e entre os índices de retenção calculados com valores da literatura especializada.

3.1.4 Caracterização físico-química do óleo essencial

3.1.4.1 Determinação da densidade relativa $^{20}d_{20}$

A densidade relativa do óleo essencial foi determinada através do método do picnômetro, por comparação das massas de igual volume da amostra e da água recém destilada a 25 °C (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

3.1.4.2 Determinação do índice de refração $^{20}_nD$

O índice de refração do óleo essencial foi obtido em refratômetro de Abbé (Analytik Jena[®], Jena, Alemanha), em função da luz de sódio no comprimento de onda de 589,3 nm e a temperatura de 25 °C, segundo procedimento n.º. 921.08 da A.O.A.C. (2000). A calibração do aparelho foi feita com água destilada, cujo índice de refração é de 1,33325 a 25 °C.

3.1.4.3 Determinação da solubilidade do óleo essencial em álcool

Para esse teste, foram utilizados balões volumétricos de 10 mL contendo um volume constante do óleo essencial, sobre o qual era adicionado proporcionalmente volume crescente de álcool 90% (v/v) até a sua completa solubilização (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

3.1.4.4 Cor

A técnica proposta foi a visual, feita por comparação das cores das essências com as cores conhecidas.

3.1.4.5 Aparência

A técnica proposta também foi a visual, onde se faz uma comparação das essências no que diz respeito a sua transparência ou limpidez.

3.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Croton rhamnifolioides*

3.2.1 Micro-organismos utilizados, manutenção e padronização

As bactérias utilizadas foram: *Aeromonas hydrophila* INCQS 7966, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 25923 e *Salmonella* Enteritidis CDC 49812.

Os micro-organismos testes foram mantidas em tubos de ensaio contendo Ágar Muller-Hinton inclinado sob uma temperatura de 8 °C (± 1 °C). Para os experimentos foram utilizados repiques de 24 horas das culturas estoque incubados em tubos de ensaio contendo Muller-Hinton a 37 °C para *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* e *S. Enteritidis* e 28 °C para *A. hydrophila*.

Os inóculos dos micro-organismos teste utilizados nos ensaios antimicrobianos, foram obtidos através da preparação de suspensões das estirpes em solução salina (NaCl a 0,85% p/v) estéril a partir de culturas recentes. Tais suspensões tiveram sua turbidez comparada e

ajustada à turbidez apresentada pelo do tubo 0,5 da escala de McFarland, a qual corresponde a um inóculo de aproximadamente 10^8 UFC/mL. (DRUTZ, 1987; BELÉM, 2001).

3.2.2 Ensaio de difusão em placas

A avaliação preliminar da atividade antibacteriana do óleo essencial de *C. rhamnifolioides* foi realizada através da técnica de difusão em meio sólido. Para tanto, utilizou-se discos de papel Whatmann com 6 mm de diâmetro em placas de Petri contendo Ágar Müller-Hinton. As culturas ativas das bactérias foram inoculadas por espalhamento com auxílio da alça de Drigalski estéril, nas placas, num volume de 100 μ L (10^8 UFC/mL) (BAUER et al., 1966; NAIR et al., 2005). Em seguida, um disco de papel filtro impregnado com 20 μ L do óleo essencial foi colocado na placa de Petri contendo o ágar inoculado com a suspensão microbiana. O sistema foi incubado a 35-37 °C/24 horas, sendo considerado como atividade antimicrobiana positiva quando observado a formação de halo de inibição do crescimento microbiano com diâmetro igual ou superior a 10 mm (SOUZA et al., 2005). Os ensaios foram realizados em triplicata utilizando como controles positivos gentamicina (10 μ g/mL) e tetraciclina (30 μ g/mL) e como controle negativo Tween 80 e água destilada.

3.2.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A CIM foi determinada através da técnica de macrodiluição em caldo. Para tal, foram preparados tubos de ensaio contendo 5 mL de caldo Muller-Hinton duplamente concentrado acrescidos de 0,15 g.100mL⁻¹ de ágar bacteriológico e suplementados com 4 mL das concentrações do óleo essencial que variaram de 0,3-160 μ L/mL. Em seguida, foi adicionado de 1 mL do inóculo das estirpes teste, sendo o sistema incubado a 37 °C para *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella* Enteritidis e 28 °C para *Aeromonas hydrophila* por 24 horas. Ao término do período de incubação, a mais baixa concentração do antimicrobiano que não apresentou crescimento microbiano visível (turvação) foi considerada como a CIM. Após esta observação, alíquotas de 100 μ L dos tubos que não apresentaram crescimento microbiano visível, foram inoculadas em tubos de ensaio contendo Ágar Muller-Hinton inclinado, incubadas por 24 horas a 37 e 28 °C. A CBM foi considerada como a menor concentração do óleo essencial capaz de inibir o crescimento das

estirpes teste após incubação de 24 horas. Como ensaios controle, foram utilizados sistemas sem adição de antimicrobianos (FU et al., 2007).

3.2.4 Influência do óleo essencial sobre a cinética microbiana

O estudo da interferência do óleo essencial sobre a cinética de crescimento dos microorganismos foi realizado através do método de contagem de células viáveis. Para tanto, foi observada a viabilidade das estirpes teste quando expostas a diferentes concentrações do óleo essencial (CIM/2, CIM, CIM x 2) por diferentes intervalos de tempo (0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 horas) a 37 °C para *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella* Enteritidis e 28 °C para *Aeromonas hydrophila*. Nos intervalos estabelecidos uma alíquota (1 mL) de cada sistema foi retirada e diluída seriadamente (10^1 - 10^5) em água peptonada 0,1% estéril, seguida por uniforme inoculação em placa de Petri contendo ágar Muller-Hinton por 24 horas a 37 °C ou 28 °C. No experimento controle, a solução do óleo essencial foi substituída por água destilada estéril. Após o fim do período de incubação, foi realizada a contagem do número de células viáveis, a qual foi expressa em log de UFC/mL (BARROS et al., 2009).

3.2.5 Avaliação da atividade do óleo essencial no queijo minas frescal

Para esse ensaio, foram produzidos 5 queijos minas frescal a partir de leite bovino cru, com aproximadamente 150g cada, e sem conservantes com a finalidade de obter um produto de alta carga microbiana para uma melhor visualização de uma possível ação antimicrobiana no produto testado.

Inicialmente, foi preparada uma formulação do óleo essencial com a finalidade de inseri-lo na composição do queijo. Essa formulação teve por objetivo dar estabilidade ao óleo e diminuir seu poder de volatilização para que não ocorra degradação do produto após esse ser adicionado no queijo. A formulação foi preparada contendo óleo essencial, glicerina e ágar numa proporção de 50, 49,5 e 0,5%, respectivamente, onde o ágar e a glicerina atuam como agente emulsificante e coemulsificante, respectivamente (BURT, 2004).

As concentrações do óleo essencial utilizadas na produção das amostras de queijo minas frescal foram (0,5%, 1%, 2% e 4%) determinadas de acordo com os resultados obtidos nos ensaios *in vitro* para determinação do CIM e CBM das bactérias ensaiadas. Para o

controle dos testes microbiológicos, produziu-se um queijo sem adição de óleo essencial e conservante.

Para a produção do queijo minas frescal com adição de óleo essencial foram utilizados os procedimentos esquematizados na Figura 4. Os queijos elaborados foram avaliados por um período de 15 dias, em função do prazo de validade estabelecido comercialmente.

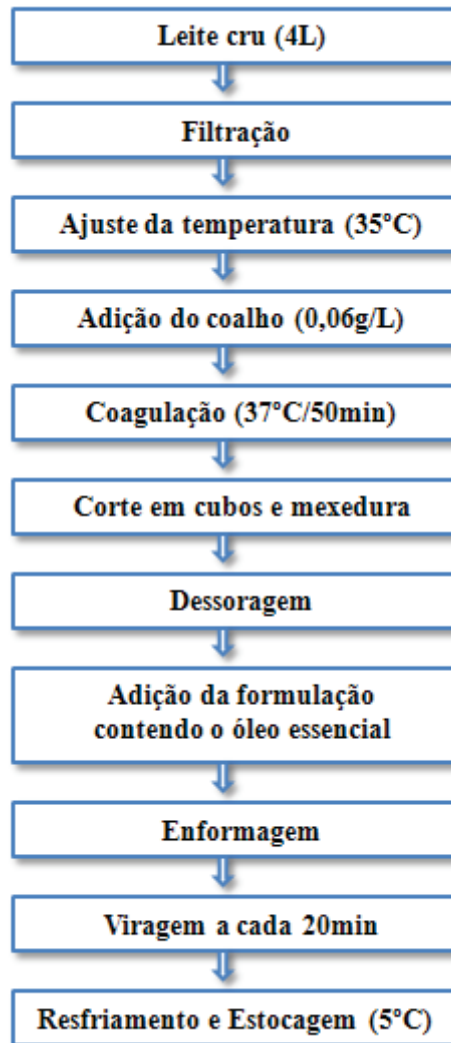


Figura 4 – Procedimentos sequenciais para elaboração do queijo minas frescal adicionado de óleo essencial.

3.2.6 Análises microbiológicas

Após 0, 3, 6, 9, 12 e 15 dias de armazenamento, uma alíquota de 10g de cada amostra de queijo foi pesada e seriadamente diluída (1:9 p/v) em água peptonada 0,1% estéril (10^{-1} – 10^{-4}). Em seguida, foram realizados testes para contagem de bactérias aeróbias mesófilas,

contagem de colônias típicas de *Staphylococcus aureus*, enumeração de coliformes a 37 e 45 °C e pesquisa de *Salmonella* sp e *Listeria* sp. de acordo com os procedimentos descrito por Vanderzant; Spplittstoesser (1992).

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados estatisticamente através de cálculos de média, desvio padrão, análise de variância e teste de Tukey com significância ao nível de 5% ($p < 0,05$), utilizando o *software* STATISTICA versão 7.0 (Statsoft Inc, USA).

4 RESULTADOS

4.1 ARTIGO 1

Escrito de acordo com as normas da revista: Food Chemistry

Composição química e atividade antibacteriana do óleo essencial das folhas de *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm

Ana Caroliny Vieira da Costa ^a, Vicente Queiroga Neto ^b, Geiseanny Fernandes do Amarante Melo ^a, Felício Garino Junior ^c, José Galberto Martins da Costa ^d, Marta Suely Madruga ^a

^aLaboratório de Química de Alimentos, Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba, 58059-900 João Pessoa, Paraíba, Brasil.

^bUnidade Acadêmica de Ciências Biológicas, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Campus Patos, Paraíba, Brasil.

^cLaboratório de Microbiologia, Hospital Veterinário, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Campus Patos, Paraíba, Brasil.

^dLaboratório de Pesquisa de Produtos Naturais, Universidade Regional do Cariri, Crato, Ceará, Brasil.

Resumo

O presente estudo descreve a composição química e a atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm, uma planta aromática amplamente distribuída no Nordeste do Brasil e largamente utilizada na medicina popular. Cromatografia gasosa – espectrometria de massa foi utilizada para determinar sua composição. Oito componentes foram identificados, sendo 1,8-cineol (46,32%) o composto majoritário, seguido por 1-felandreno (16,70%), p-cimeno (10,21%), sabineno (8,14%) e trans-cariofileno (4,81%). O óleo essencial apresentou atividade antibacteriana contra *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Enteritidis* e *Staphylococcus aureus* com valores de CIM e CBM entre 2,5 - 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ e 5 - 40 $\mu\text{L}/\text{mL}$, respectivamente. Além disso, o óleo essencial também afetou a viabilidade celular destas bactérias.

Palavras-chaves: *Croton rhamnifolioides*, óleo essencial, atividade antimicrobiana, composição química.

1 Introdução

O gênero *Croton*, segundo maior da família Euphorbiaceae, tem aproximadamente 1.300 espécies distribuídas nas regiões tropicais e semi-tropicais, sendo o Brasil o país que apresenta a maior diversidade do gênero, com cerca de 350 espécies (Berry, Hipp, Wurdack, & Rina, 2005). Muitas espécies deste gênero possuem forte potencial econômico, devido aos diversos metabólitos secundários, como alcalóides, flavonóides e terpenóides (Payo, Dominicis, Mayor, Oquendo, & Sarduy, 2001), os quais conferem propriedades terapêuticas a muitas espécies. Grande parte das espécies são aromáticas por apresentarem conteúdo relativamente elevado em óleo essencial, cuja composição química é rica em mono e sesquiterpenos, além de fenilpropanóides (Salatino, Salatino & Negri, 2007).

As espécies deste gênero são utilizadas com frequência na medicina popular para os mais variados fins, em especial por indivíduos que vivem afastados dos grandes centros populacionais. Dentre as atividades biológicas experimentalmente comprovadas para o gênero *Croton* destacam-se o seu potencial antiinflamatório (Suárez, Compagnone, Salazar-

Bookaman, Zapata, & Alvarado, 2006), antiulcerogênico (Almeida et al., 2003), antimicrobiano (Abo, Ogunleye & Ashidi, 1999), antidiabético (Okokon, Bassey & Obot, 2006), antiespasmódico (Pinho-da-Silva et al., 2010), antinociceptiva (Santos, Jeferson, Santos, Silveira, & Rao, 2005).

Dentre as atividades biológicas, a antimicrobiana de óleos essenciais vem sendo bastante pesquisada em virtude do seu potencial para aplicações em produtos alimentícios e em indústrias farmacêuticas. Este aspecto assume uma relevância particular devido ao aumento da resistência de algumas bactérias aos antibióticos mais comuns e aos agentes microbianos utilizados na preservação de alimentos (Adams, 2002). Neste sentido, a busca de novos agentes antibacterianos derivados de produtos naturais de plantas poderia ser uma alternativa, por terem uma diversidade molecular muito superior àquelas derivadas de produtos sintéticos (Oliveira et al., 2006).

Croton rhamnifolioides Pax & Hoffm, conhecido popularmente como “quebra-faca” ou “caatinga branca” é uma espécie endêmica no Nordeste do Brasil. Tem a forma de um subarbusto ou arbusto, possuidora de aroma agradável e bastante usada popularmente no tratamento de úlceras, inflamações e hipertensão sob a forma de chás e infusões (Randau, Florêncio, Ferreira & Xavier, 2004), no entanto, estudos direcionados à avaliação das possíveis propriedades biológicas desta espécie ainda são escassos ou inexistentes. O objetivo deste estudo foi identificar a composição química e avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de folhas do *Croton rhamnifolioides* frente a bactérias patogênicas de interesse em alimentos.

2 Material e Métodos

2.1 Material Botânico

As folhas da *C. rhamnifolioides* foram coletadas na zona rural do município de Sumé-PB, (7°40'S: 36°52'O, altitude a nível do mar de 532m), situada na mesorregião do Cariri paraibano, no período de agosto a setembro de 2010. A identificação do material foi realizada pela equipe funcional do Herbário da Universidade Federal de Campina Grande, Patos, Paraíba, Brasil, e a exsicata da planta está depositada sob o número de registro 691.

2.2 Extração do óleo essencial

O óleo essencial das folhas frescas da caatinga branca foi obtido pelo processo de hidrodestilação utilizando o aparelho extrator Clevenger, por um período de duas horas. Em seguida, a fração de óleo essencial extraída foi seca com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) para retirada dos últimos resquícios de água, e armazenada em recipiente de vidro âmbar hermeticamente fechado a temperatura de 4 °C, até a realização das análises químicas e antimicrobianas, por um período não superior a 6 meses.

2.3 Cromatografia gasosa – espectometria de massa (CG-MS)

A análise da composição química do óleo essencial foi realizada usando um sistema cromatografia gasosa acoplado a espectro de massa (CG/EM), em aparelho SHIMADZU com detector seletivo de massa QP2010A, operando sob energia de ionização de 70 eV. A coluna de capilaridade utilizada foi OV (30 m x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 mm filme); nas seguintes especificações: temperaturas de 230 °C no injetor e 290 °C no detector, tendo hélio como gás de arraste (1,0 mL/min); velocidade linear de 47,3 cm/s; fluxo total de 24 mL/min; fluxo de portador de 24 mL/min; pressão de 107,8 kPa; e a temperatura de aquecimento da coluna foi programada para 60 °C (2 min) - 180 °C (1 min) a 4 °C/min e de 180 - 260 °C a 10 °C/min (10 min). A identificação dos componentes foi realizada por comparação entre seu respectivo espectro de massa com aqueles padrões registrados na base de dados da biblioteca Wiley 229 e entre os índices de retenção calculados com valores da literatura especializada.

2.4 Atividade Antibacteriana

2.4.1 Estirpes bacterianas

As bactérias utilizadas para avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial foram *Aeromonas hydrophila* (INCQS 7966), *Escherichia coli* (ATCC 25923), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Salmonella* Enteritidis (CDC 49812). Para o preparo do inóculo, cultivou-se as colônias em Ágar Muller-Hinton (HiMedia ®, Mumbai, Índia) a 35 °C, em aerobiose, por 24 horas. Em seguida, fez-se a

suspensão em solução salina estéril 0,85% (p/v), sendo esta ajustada à escala 0,5 McFarland, obtendo-se suspensões padronizadas equivalentes a 10^8 UFC/mL.

2.4.2 Ensaio de difusão em disco

A avaliação preliminar da atividade antibacteriana do óleo essencial de *C. rhamnifolioides* foi realizada através da técnica de difusão em meio sólido, utilizando-se discos de papel Watmann número 3, com 6 mm de diâmetro. Em placas de Petri contendo Ágar Muller-Hinton foi adicionado 0,1 mL do inóculo do micro-organismo teste. Em seguida, um disco de papel impregnado com 20 μ L do óleo essencial foi colocado na placa de Petri contendo o ágar inoculado com a suspensão microbiana (Bauer, Kirby, & Turck, 1966). O sistema foi incubado a 35-37 °C/24 horas, sendo considerada como atividade antimicrobiana positiva quando observado a formação de halo de inibição do crescimento microbiano com diâmetro igual ou superior a 10 mm (Souza, Stamford, Lima, Trajano & Filho, 2005). Os ensaios foram realizados em triplicata, utilizando como controles positivos gentamicina (10 μ g/disco) e tetraciclina (30 μ g/disco) e, como controle negativo Tween 80 e água destilada.

2.4.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A CIM do óleo essencial foi determinada utilizando o método de macrodiluição em caldo. Para isso, 5 mL de Caldo Muller-Hinton (HiMedia ®, Mumbai, Índia) duplamente concentrado foi acrescido de 1 mL do inóculo das estirpes teste, e 4 mL das concentrações do óleo essencial que variaram de 0,03-160 μ L/mL. Em seguida, o sistema foi incubado a 37 °C para *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* e *S. Enteritidis*, e 28 °C para *A. hydrophila*, por 24 horas. Ao término do período de incubação, a mais baixa concentração do antimicrobiano que não apresentou crescimento microbiano visível foi considerada como a CIM. Após esta observação, alíquotas de 100 μ L dos tubos que não apresentaram crescimento microbiano visível, foram inoculadas em tubos de ensaio contendo Ágar Muller-Hinton inclinado, por 24 horas a 28 ou 37 °C. A CBM foi considerada como a menor concentração do óleo essencial capaz de inibir o crescimento bacteriano após incubação de 28 ou 37 °C por 24 horas. Como ensaios controle, foram utilizados sistemas sem adição de antimicrobianos (Fu, Zu, Chen, Shi, Wang, & Sun, 2007).

2.4.4 Efeito do óleo essencial sobre a contagem de células viáveis

A viabilidade das bactérias em estudo foi avaliada quando expostas a diferentes concentrações do óleo essencial (CIM/2, CIM, CIM x 2) por diferentes intervalos de tempo (0, 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas) a 37 °C para *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella* Enteritidis e 28 °C para *Aeromonas hydrophila*. Nos intervalos estabelecidos, uma alíquota (1 mL) de cada sistema foi retirada e diluída seriadamente em água peptonada 0,1% estéril ($10^1 - 10^5$) e inoculada em placa de Petri contendo Ágar Muller-Hinton por 24 horas a 37 °C ou 28 °C. Após o período de incubação, foi realizada a contagem do número de células viáveis, a qual foi expressa em log de UFC/mL (Barros et al., 2009). No experimento controle, a solução do óleo essencial foi substituída por água destilada estéril.

2.5 Análise estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente através de cálculos de média, desvio padrão, análise de variância e teste de Tukey com significância ao nível de 5% ($p < 0,05$), utilizando o *software* STATISTICA versão 7.0 (Statsoft Inc, USA).

3 Resultados e discussão

3.1 Composição química

Os constituintes identificados por CG-EM, os tempos de retenção e as porcentagens das concentrações estão apresentados na Tabela 1. Oito substâncias foram identificadas, correspondendo a 100% da composição total do óleo, dos quais 65,2% são monoprenos e 34,8% sesquiterpenos. Entre os compostos identificados, 1,8-cineol (46,32%) foi o composto majoritário. Outros componentes em concentração significativa também foram encontrados, como 1-felandreno (16,70%), p-cimeno (10,21%), sabineno (8,14%) e trans-cariofileno (4,81%).

Apesar de não haver estudos a respeito da composição química do óleo essencial de *C. rhamnifolioides*, os compostos identificados neste estudo são compatíveis com dados da literatura para espécies de *Croton* cujos óleos essenciais são caracterizados pela

predominância de monoterpenos e sesquiterpenos como principais componentes (Meccia et al., 2000; Fontenelles et al., 2008).

3.2 Atividade antimicrobiana

Os resultados da atividade antibacteriana do óleo essencial das folhas de *C. rhamnifolioides* sobre as bactérias de interesse em alimentos estão apresentados na Tabela 2. Pode-se observar que o óleo essencial, na concentração absoluta, apresentou atividade frente às cinco bactérias ensaiadas, uma vez que os diâmetros das zonas de inibição variaram entre 13-21 milímetros. *L. monocytogenes* apresentou a maior zona de inibição (21 mm) e as Gram-negativas *E. coli* e *S. Enteritidis* apresentaram resultados semelhantes com zonas de inibição de 13 mm.

Na Tabela 3, observa-se os resultados da CIM e CBM do óleo essencial de *C. rhamnifolioides* contra as bactérias ensaiadas. Pode-se verificar que o óleo essencial foi ativo contra as cinco bactérias estudadas, apresentando valores de CIM que oscilaram entre 2,5 e 20 µL/mL. *L. monocytogenes* mostrou-se como a estirpe com maior sensibilidade *in vitro*, apresentando a mais baixa CIM de 2,5 µL/mL, enquanto *E. coli* e *S. Enteritidis* apresentaram sensibilidade a ação do óleo na concentração 20 µL/mL. O comportamento de menor sensibilidade destas duas bactérias pôde ser notado também na interação com o óleo essencial na concentração absoluta, visto que desenvolveram os menores halos de inibição do crescimento (13 mm). Em relação à atividade bactericida, o óleo teve suas CBMs entre 5 e 40 µL/mL.

A partir dos resultados observados nesse estudo, verificou-se que o comportamento do óleo, quando avaliado pela metodologia adotada, mostrou uma melhor atividade inibitória frente às bactérias Gram-positivas. Esses resultados podem estar diretamente relacionados com a estrutura da parede celular, tendo em vista que esta é a principal característica que diferencia os dois grupos bacterianos, onde a presença da membrana externa das cepas Gram-negativas acaba atuando como barreira para certos tipos de antibióticos, enzimas digestivas, detergentes e metais pesados (Bagamboula et al., 2004), e poderia assim estar impedindo a ação do óleo essencial. Entretanto, alguns autores postulam que esta relação de estrutura celular e sensibilidade não é ainda bem estabelecida nas interações entre óleos essenciais e micro-organismos. Sugere-se que uma menor ou maior atividade inibitória de óleos essenciais sobre micro-organismos Gram-positivos ou Gram-negativos, poderia estar relacionada com o

grau de efetividade particular que os seus componentes individuais exercem sobre os diferentes tipos de micro-organismos (Dorman; Deans, 2000).

Rossi et al., (2011) avaliando a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Croton lechleri*, observou que as bactérias Gram-negativas foram mais sensíveis a ação do óleo. Segundo estudo realizado por Cimanga et al. (2002), onde se avaliou a atividade antimicrobiana de óleos essenciais de diversas espécies vegetais, dentre elas *Eucalyptus globulus*, *Cymbopogon citratus*, *Ocimum americanum* e *Monodora myristica*, a atividade antimicrobiana variou de espécie para espécie, devido à infinidade e variabilidade de compostos químicos presentes, embora de forma geral os óleos essenciais tenham sido ativos principalmente contra os micro-organismos Gram-positivos.

A atividade antibacteriana do óleo essencial de *C. rhamnifolioides* em estudo pode ser atribuída à presença de compostos como 1,8-cineol, α -pineno, 1-felandreno e p-cimeno relatados na literatura como possuidores de propriedades antimicrobianas (Oke et al., 2009; Ait-Ouazzou, 2011). Delamare et al. (2007) afirmaram que a atividade antimicrobiana não se deve somente à presença dos compostos majoritários, a presença de outros componentes em baixas concentrações pode provocar interações sinérgicas, aditivas ou antagônicas. Além disso, a atividade antimicrobiana pode não ser atribuída a um mecanismo específico, mas a vários efeitos na célula bacteriana, tais como: degradação da parede celular; dano à membrana citoplasmática; danos às proteínas de membrana; vazamento (perda) de conteúdo celular; coagulação do citoplasma; e depleção da força próton motriz (Carson, Mee & Riley, 2002) devido aos inúmeros componentes individuais com atividade antimicrobiana.

3.3 Efeito do óleo sobre a contagem de células viáveis

O resultado do efeito do óleo essencial de *C. rhamnifolioides* em diferentes concentrações (CIM/2, CIM e CIM x 2) sobre a viabilidade celular das bactérias de interesse em alimentos testadas são mostrados nas Figura 1-5. A curva de morte, ou o estudo da cinética microbiana, apresenta-se como uma forma dinâmica de mensurar a capacidade de um composto de agir sobre a viabilidade de um micro-organismo. Como se pode observar, o óleo essencial causou em todas as concentrações uma redução no número de células viáveis para as cinco bactérias ensaiadas, a qual foi evidenciada por valores de UFC/mL sempre menores daqueles observados no experimento controle.

O óleo essencial nas concentrações de CIM e CIM/2 causou redução da contagem bacteriana variando de 1 a 2,8 ciclos logarítmicos, em relação a carga inicial, ao longo dos

períodos avaliados para todas as bactérias ensaiadas, exceto *S. Enteritidis*. Para *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *E. coli* não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre CIM e CIM/2 a partir de 10 horas de contato com o óleo. A ação bacteriostática caracteriza-se pela efetividade de uma substância em tornar uma bactéria incapaz de crescer/multiplicar-se em caldo, porém capaz de ser cultivada quando uma alíquota do caldo de incubação é plaqueada em um ágar adequado para o seu crescimento (Smith-Palmer, Stewart & Fyfe, 1998). Os experimentos controle apresentaram um crescimento gradual ao longo dos intervalos estudados.

Um efeito bactericida foi observado pelo óleo essencial na concentração de 20 $\mu\text{L/mL}$ sobre a estirpe de *A. hydrophila* com redução de 4 ciclos logarítmicos durante 1 hora de exposição (Figura 1). Para *S. aureus* e *E. coli* o efeito bactericida se deu após 6 horas nas concentrações de 10 e 20 $\mu\text{L/mL}$, respectivamente, e para *L. monocytogenes* após 8 horas. Algumas pesquisas têm considerando que um composto deve ser reconhecido como possuidor de um forte efeito bactericida quando capaz de causar uma diminuição de 1000 vezes (3 ciclos logarítmicos ou 99,9%) do inóculo inicial (Ernst et al., 1996; LaPlante, 2007).

É importante destacar que, para *S. Enteritidis* (Figura 5), apesar da interação com o óleo na maior concentração não ter apresentado ação bactericida ao longo de 12 horas, na interação com a concentração (20 $\mu\text{L/mL}$) houve uma redução na carga microbiana de 2 ciclos logarítmicos em relação ao controle, ou seja, uma redução ao redor de 100 vezes. Na concentração mais baixa, referente ao CIM/2, o óleo conseguiu manter a carga microbiana sempre um pouco abaixo da carga inicial que foi de 10^6 UFC/mL. Por sua vez, o experimento controle mostrou no tempo de 12 horas uma população microbiana ao redor de 10^8 UFC/mL, ou seja, um aumento de 100 vezes do valor do inóculo inicial.

4 Conclusão

Estes resultados evidenciam o potencial antibacteriano do óleo essencial das folhas de *C. rhamnifolioides*, sugerindo a possibilidade do emprego na inibição do crescimento e sobrevivência de patógenos alimentares, propiciando uma possível aplicabilidade, como barreira adicional, com o intuito de aumentar a qualidade dos alimentos e atender ao perfil atual dos consumidores que buscam pelos benefícios creditados a uma alimentação mais saudável.

Agradecimento

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro e a Universidade Regional do Cariri.

Referências

- Ait-Ouzzou, A., Cherrat, L., Espina, L., Larán, S., Rota, C., & Pagán R. (2011). The antimicrobial activity of hydrophobic essential oil constituents acting alone or in combined processes of food preservation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12, 3, 320-390.
- Abo, K.A., Ogunleye, V.O., & Ashidi, J.S. (1999). Antimicrobial potential of *Spondias mombin*, *Croton zambesicus* and *Zygotritonia crocea*. *Phytotherapy Research*, 13, 6, 494–497.
- Adam, D. (2002). Global antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50, 4, 1-5.
- Almeida, A. B. A., Melo, P. S., Lima, C. A. H., Gracioso, J. S., Carli, L., Nunes, D. S., Haun, M., & Brito, A. R. M. (2003). Antiulcerogenic effect and cytotoxic activity of semi-synthetic croton in obtained from *Croton cajucara* Benth. *European Journal of Pharmacology*, 472, 11, 205-212.
- Barros, J. C., Conceição, M. L., Gomes Neto, N. J., Costa, A. C. V., Siqueira Júnior, J. P., Basílio Júnior, I. D., & Souza, E. L. (2009). Interference of *Origanum vulgare* L. essential oil on the growth and some physiological characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. *LWT- Food Science and Technology*, 42, 6, 1139-1143.
- Bauer, A. W. M., Kirby, J. C., & Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45, 3, 493-496.
- Berry, P. E., Hipp, A. L., Wurdack, K. L., Van, E. E., & Riina, R. (2005). Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe Crotonaeae (Euphorbiaceae sensu stricto) using ITS and trnL-trnF sequence data. *American Journal of Botany*, 92, 9, 1520–1534.
- Carson C.F., Mee, B.J., & Riley, T.V. (2002). Mechanism of action of *Malaleuca artemifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46, 6, 1914-1920.
- Cimanga, K., Kambu, K., Tona, L., Apers, S., Bruyne, T. De, Hermans, N., Totté, J., Pieters, L., & Vlietinck, A. J. (2002). Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *Journal of Ethnopharmacology*, 79, 2, 213–220.

- Delamare, A. P. L., Moschen-Pistorelo, I. V., Artico, L., Atti-Serafini L., & Echeverrigary, S. (2007). Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. And *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. *Food Chemistry*, 100, 2, 603-608.
- Dorman, H.J.D., & Deans, S.G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 2, 308-316.
- Dourado, R. C. M., & Silveira, E. R. (2005). Preliminary investigation on the volatile constituents of *Croton sonderianus* Muell. Arg.: Habitat, plant part and harvest time variation. *Journal of Essential Oil Research*, 17, 1, 36-40.
- Ernst, M.E., Klepser, E.J., Wolfe, E.J., & Pfaller, M.A. (1996). Antifungal dynamics of LY 303366, an investigation echinocandin B analog, against *Candida* spp. *Diagnostic in Microbial Infectious Diseases*, 26, 3, 125-131.
- Fontenelle, R. O. S., Morais, S. M., Brito, E. H. S., Brilhante, R. S. N., Cordeiro, R. A., & Nascimento, N. R. F. (2008). Antifungal activity of essential oils of *Croton* species from the Brazilian Caatinga biome. *Journal of Applied Microbiology*, 104, 5, 1383-1390.
- Fu, Y., Zu, Y. G., Chen, L. Y., Shi, X. G., Wang, Z., Sun, S. (2007). Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. *Phytotherapy Research*, 21, 10, 989-994, 2007.
- LaPlante, K.L. (2007). In vitro activity of lysostaphin, mupirocin, and tea tree oil against clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Diagnostic in Microbiology and Infectious Diseases*, 57, 4, 413-418.
- Meccia, G., L. B. Rojas, C. Rosquete & A. San-Feleciano. (2000). Essential oil of *Croton ovalifolius* Vahl from Venezuela. *Journal Flavour Fragrance*, 15, 3, 144-146.
- Oke, F., Aslim, B., Ozturk, S., & Altundag, S. (2009). Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja cuneifolia* Ten. *Food Chemistry*, 112, 4, 874-879.
- Okokon, J., Basse, A., & Obot, J., (2006). Antidiabetic activity of ethanolic leaf extract of *Croton zambesicus* muell. (thunder plant) in alloxan diabetic rats. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicine*, 3, 2, 21-26.
- Oliveira, D. R., Leitão, G. G., Santos, S. S., Bizzo, H. R., Lopes, D., Alviano, C. S., Alviano, D. S., & Leitão, S. G. (2006). Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximina, Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, 108, 1, 103-108.
- Payo, H. A., Dominicis, M. E., Mayor, J., Oquendo, M., & Sarduy, R. (2001). Tamizaje fitoquímico preliminar de especies del género *Croton* L. *Revista Cubana de Farmacia*, 35, 203-206.
- Pinho-da-Silva, P. L., Maia, P. V., Garcia, T. M., Cruz, J. S., Morais, S. M., Souza, A. N. Lahlou, S., & Cardoso, J.H. (2010). *Croton sonderianus* essential oil samples distinctly affect rat airway smooth muscle. *Phytomedicine*, 17, 10, 721-725.

Randau, K. P, Florêncio, D. C., Ferreira, C.P., & Xavier, H. S. (2004). Pharmacognostic study of *Croton rhamnifolius* H.B.K. and *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm. (Euphorbiaceae). *Brazilian Journal of pharmacognosy*, 14, 2, 89-96.

Rossi, D., Guerrini, A., Maietti, S., Bruni, R., Paganetto, G., Poli, F., Scalvenzi, L., Radice, M., Saro, K., & Sacchetti, G. (2011). Chemical fingerprinting and bioactivity of Amazonian Ecuador *Croton lechleri* Müll. Arg. (Euphorbiaceae) stem bark essential oil: A new functional food ingredient?. *Food Chemistry*, 126, 3, 837-848.

Salatino, A., Salatino, M. L. F., & Negri, G. (2007). Traditional uses, Chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 18, 1, 11-33.

Santos, F.A., Jeferson, F.A., Santos, C.C., Silveira, E.R., & Rao, V.S. (2005). Antinociceptive effect of leaf essential oil from *Croton sonderianus* in mice. *Life Science*, 77, 23, 2953–2963.

Suárez, A. I., Blanco, B., Compagnone, R. S., Salazar-Bookaman, M. M., Zapata, V., & Alvarado, C. (2006). Anti-inflammatory activity of *Croton cuneatus* aqueous extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 105, 1, 99-101.

Souza, E. L., Stamford, T. L. M., Lima, E. O., Trajano, V. N., & Filho, J. M. B. (2005). Antimicrobial effectiveness of spices: an approach for use in food consevation systems. *Brazilian Arquivos of Biology and Technology*, 48, 4, 549-558.

Smith-Palmer, A., Stewart, J., Fyfe, L. (1998). Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Food Microbiology*, 26, 1, 118-122.

Tabela 1 – Composição química do óleo essencial das folhas de *Croton rhamnifolioides*.

No.	Constituintes	TR (min)	(%)
1	α -pineno	5,15	8,07
2	sabineno	5,59	8,14
3	1-felandreno	5,90	16,70
4	p-cimeno	6,11	10,21
5	1,8-cineol	6,21	46,32
6	β -elemeno	9,32	2,37
7	trans-cariofileno	9,57	4,81
8	biciclogermacreno	10,10	3,38

Tabela 2 – Halos de inibição obtidos para o óleo essencial das folhas de *Croton rhamnifolioides* contra bactérias patogênicas de interesse em alimentos.

Bactérias	Halos de Inibição (mm de diâmetro)			
	Óleo Essencial (1000 μ L/mL)	Gentamicina	Tetraciclina	Água e Tween 80
<i>Staphylococcus aureus</i>	19	31	29	ND
<i>Listeria monocytogenes</i>	21	30	28	ND
<i>Aeromonas hydrophila</i>	18	30	26	ND
<i>Escherichia coli</i>	13	36	21	ND
<i>Salmonella</i> Enteritidis	13	25,2	19	ND

ND = Não detectável

Tabela 3 – Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima do óleo essencial de *Croton rhamnifolioides* frente a bactérias patogênicas de interesse em alimentos.

Bactérias testadas	CIM (μ L/mL)	CBM (μ L/mL)	Controle*
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	10	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	2,5	5	+
<i>Aeromonas hydrophila</i>	10	20	+
<i>Escherichia coli</i>	20	40	+
<i>Salmonella</i> Enteritidis	20	40	+

*Capacidade de crescimento das bactérias sem adição de óleo essencial

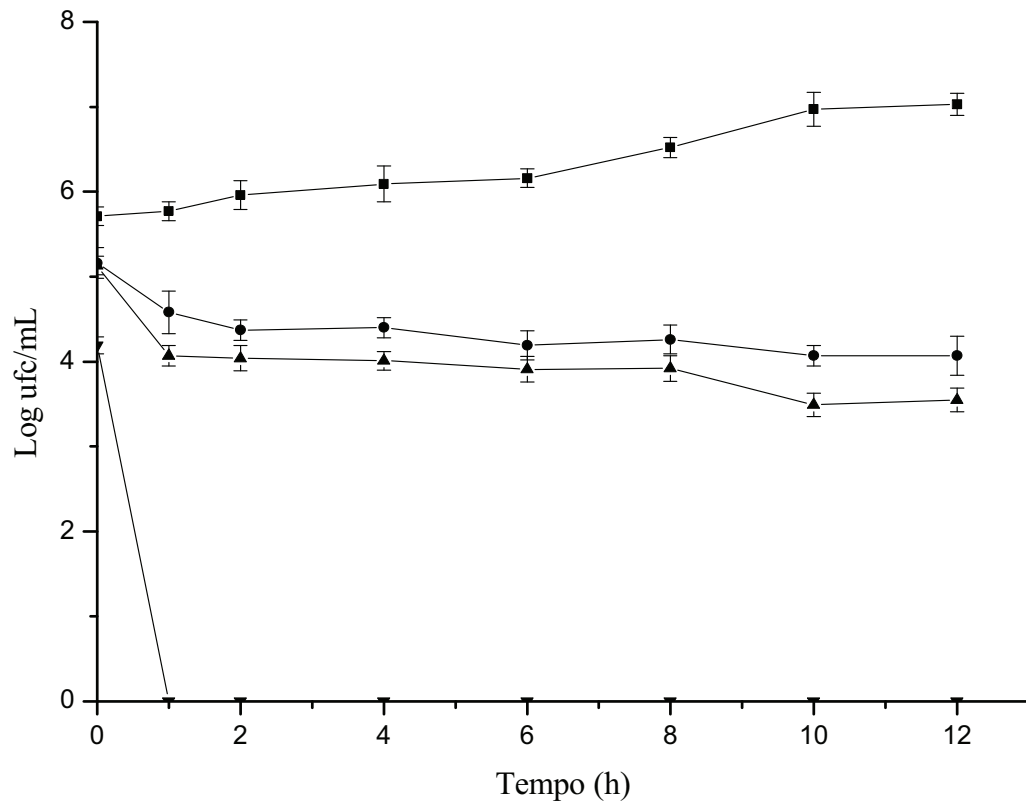


Figura 1 – Efeito do óleo essencial de *Croton rhamnifolioides* sobre a viabilidade celular de *Aeromonas hydrophila*: (■) controle (0 $\mu\text{L}/\text{mL}$); (●) CIM/2 (2,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$); (▲) CIM (5 $\mu\text{L}/\text{mL}$); (▼) CIM x 2 (10 $\mu\text{L}/\text{mL}$).

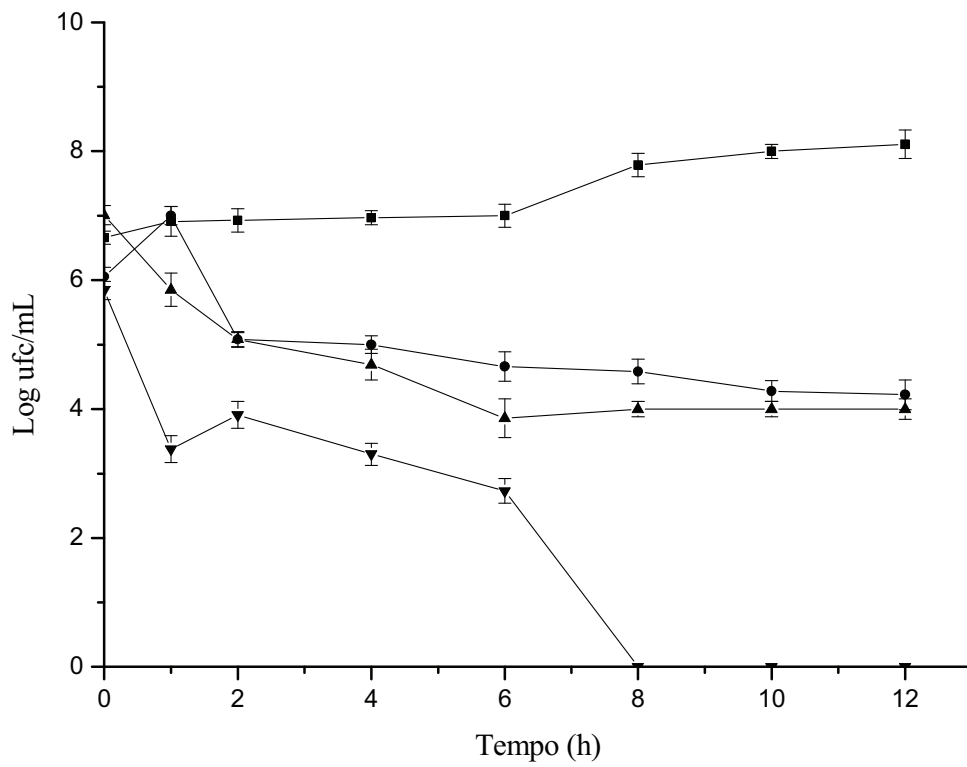


Figura 2 – Efeito do óleo essencial de *Croton rhamnifolioides* sobre a viabilidade celular de *Listeria monocytogenes*: (■) controle (0 $\mu\text{L}/\text{mL}$); (●) CIM/2 (1,125 $\mu\text{L}/\text{mL}$); (▲) CIM (2,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$); (▼) CIM x 2 (5 $\mu\text{L}/\text{mL}$).

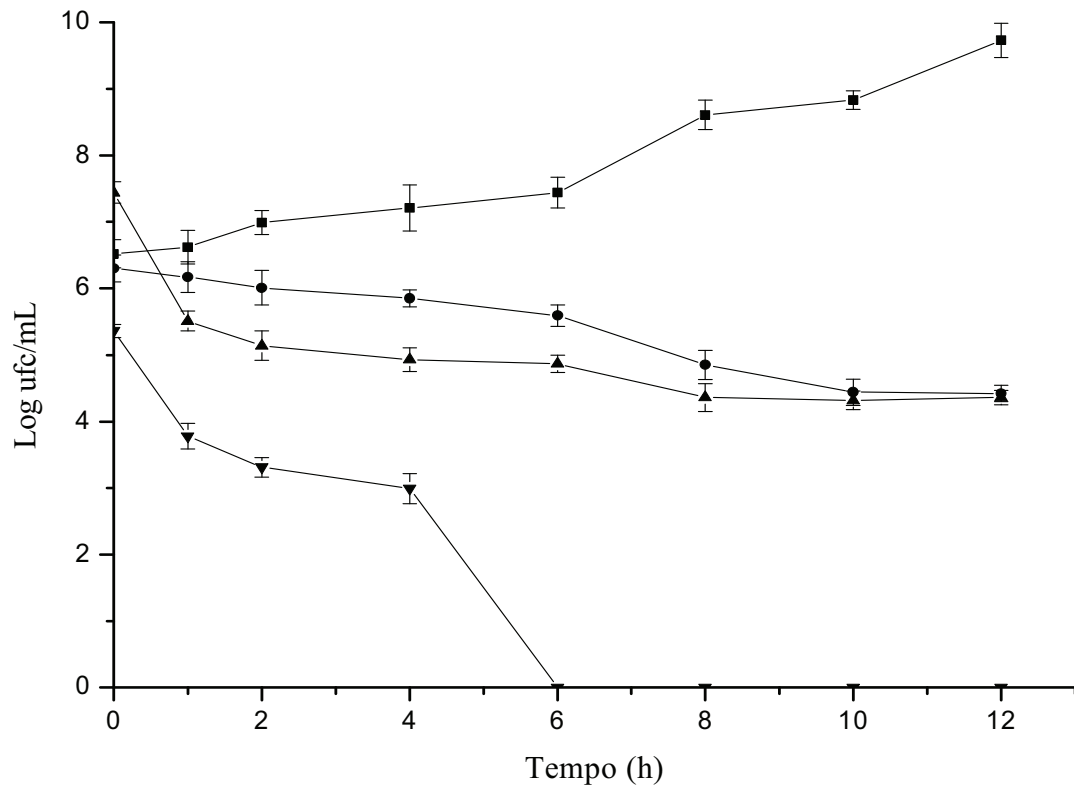


Figura 3 – Efeito do óleo essencial de *Croton rhamnifolioides* sobre a viabilidade celular de *Staphylococcus aureus*: (■) controle (0 $\mu\text{L}/\text{mL}$); (●) CIM/2 (2,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$); (▲) CIM (50 $\mu\text{L}/\text{mL}$); (▼) CIM x 2 (10 $\mu\text{L}/\text{mL}$).

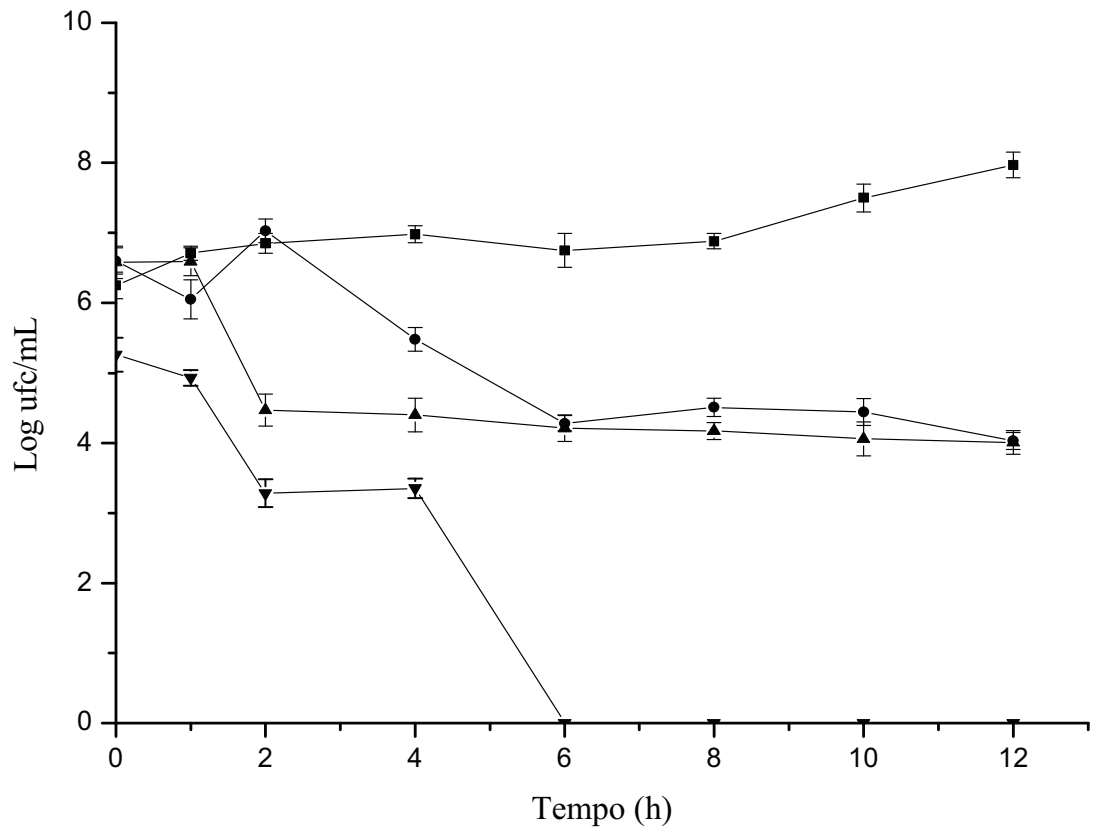


Figura 4 – Efeito do óleo essencial de *Croton rhamnifolioides* sobre a viabilidade celular de *Escherichia coli*: (■) controle (0 $\mu\text{L}/\text{mL}$); (●) CIM/2 (10 $\mu\text{L}/\text{mL}$); (▲) CIM (20 $\mu\text{L}/\text{mL}$); (▼) CIM x 2 (40 $\mu\text{L}/\text{mL}$).

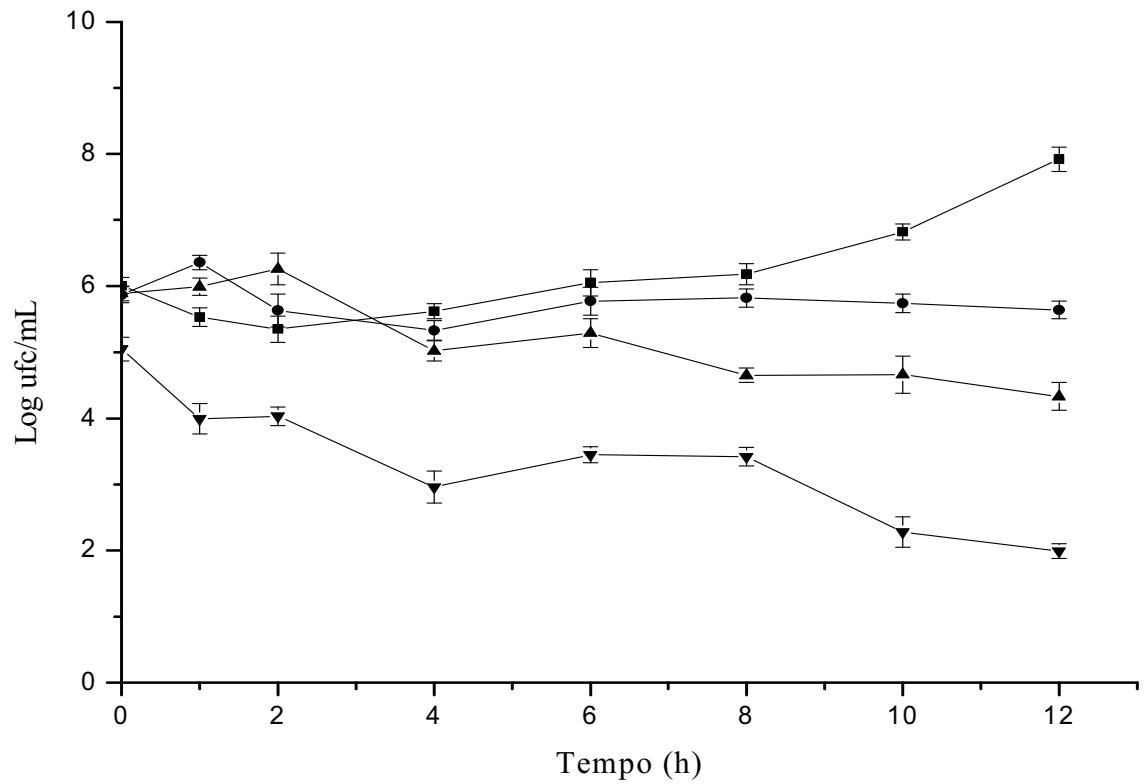


Figura 5 – Efeito do óleo essencial de *Croton rhamnifolioides* sobre a viabilidade celular de *Salmonella Enteritidis*: (■) controle (0 $\mu\text{L}/\text{mL}$); (●) CIM/2 (10 $\mu\text{L}/\text{mL}$); (▲) CIM (20 $\mu\text{L}/\text{mL}$); (▼) CIM x 2 (40 $\mu\text{L}/\text{mL}$).

4.2 ARTIGO 2

Escrito de acordo com as normas da revista: Ciência e Tecnologia de Alimentos

Atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de *Croton rhanminifolioides* Pax & Hoffm. em queijo minas frescal.

Ana Caroliny Vieira da Costa ^a, Geiseanny Fernandes do Amarante Melo ^a, Felício Garino Junior ^c, Rosália Severo de Medeiros ^b, Vicente Queiroga Neto ^b

^aLaboratório de Microbiologia de Alimentos, Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba, 58059-900 João Pessoa, Paraíba, Brasil.

^bUnidade Acadêmica de Ciências Biológicas, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Campus Patos, Paraíba, Brasil.

^cLaboratório de Microbiologia, Hospital Veterinário, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Campus Patos, Paraíba, Brasil.

Resumo

Este estudo objetivou avaliar a atividade antibacteriana do óleo essencial de *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas patogênicas de interesse em alimentos, bem como observar sua eficácia antimicrobiana quando inserido na composição do queijo minas frescal ao longo de 15 dias. Os resultados mostraram que o óleo essencial apresentou atividade para todas as bactérias ensaiadas com valores de CIM e CBM oscilando de 2,5 - 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ e 5 - 40 $\mu\text{L}/\text{mL}$, respectivamente, bem como redução da contagem da microbiota do queijo minas frescal armazenado sob refrigeração nas concentrações superiores a 1%.

Palavras-chaves: *Croton rhamnifolioides*, óleo essencial, atividade antimicrobiana, queijo minas frescal.

1 Introdução

As Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) representam um crescente e relevante problema de saúde pública, pois além do prejuízo social, a contaminação de alimentos com micro-organismos patogênicos e deteriorantes gera um enorme prejuízo econômico.

Para o alcance dos objetivos relacionados à segurança e estabilidade microbiológica de seus produtos ao longo de sua vida de prateleira, as indústrias de alimentos têm feito o uso, por longos anos, de conservantes químicos. No entanto, o uso excessivo de conservantes químicos, questionado em virtude de seu potencial de toxicidade, em soma às mudanças nos padrões nutricionais devido aos benefícios creditados a uma alimentação saudável, tem levado a um aumento da pressão sobre os fabricantes de alimentos a buscar por técnicas alternativas e mais naturais de preservação (SOUZA et al., 2005; FRIEDMAN et al., 2002; KOTZEKIDOU et al., 2007).

Neste contexto, óleos essenciais de plantas aromáticas já utilizadas como flavorizantes e com elevado potencial antimicrobiano, ganham uma nova perspectiva de uso, uma vez que apresentam uma diversidade molecular muito superior àquelas derivadas de produtos sintéticos (OLIVEIRA et al., 2006). Este aspecto assume uma relevância particular devido ao

aumento da resistência de algumas bactérias aos antibióticos mais comuns e aos agentes antimicrobianos utilizados na preservação de alimentos. Vários estudos *in vitro* já demonstraram atividade antibacteriana de óleos essenciais contra a *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp., *Escherichia coli* O157: H7, *Shigella* disenteria, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* (FRIEDMAN et al., 2002; BAGAMBOULA et al., 2004; MOREIRA et al., 2005; OUSSALAH et al., 2007; PEREIRA et al., 2008). No entanto, as informações do seu efeito em sistemas de alimentação é ainda insuficiente.

Croton rhamnifolioides, é uma espécie endêmica do Nordeste do Brasil, bastante utilizada na medicina popular, porém ainda pouco estudada. As espécies deste gênero atraem o interesse para o seu estudo como fonte promissora de novos e interessantes compostos naturais, devido à diversidade do seu uso popular, atividades biológicas e conteúdo relativamente rico em óleo essencial, constituídos principalmente por compostos fenólicos e terpenóides, os quais são acreditados por possuírem propriedades antimicrobianas (RANDAU, 2004; DOURADO; SILVEIRA, 2005).

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *C. rhamnifolioides* frente a bactérias patogênicas de interesse em alimentos e a sua eficácia na inibição da microbiota do queijo minas frescal durante o armazenamento.

2 Material e Métodos

2.1 Material Botânico

As folhas da *C. rhamnifolioides* foram coletadas no período de agosto a setembro de 2010 na zona rural do município de Sumé-PB. A classificação botânica da planta foi confirmada pela equipe funcional do Herbário da Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas do CSTR/UFCG, onde exsicata com número de registro 691 encontra-se depositada.

2.2 Extração do óleo essencial

O óleo essencial das folhas frescas da *C. rhamnifolioides* foi obtido pelo processo de hidrodestilação, utilizando o aparelho extrator Clevenger, por um período de duas horas (FARMACOPÉIA, 1997). Em seguida, a fração de óleo essencial extraída foi seca com

sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) e armazenado em recipiente de vidro âmbar, hermeticamente fechado, à temperatura de 4 °C até a realização das análises químicas e antimicrobianas.

O rendimento foi calculado através da relação do volume de óleo essencial obtido com a massa de material vegetal utilizado na extração. O resultado foi expresso em porcentagem (v/p).

2.3 Determinação dos índices físico-químicos do óleo essencial

A solubilidade do óleo essencial em álcool e a densidade relativa foram determinadas conforme preconizado na Farmacopeia Brasileira (1988). O índice de refração, determinado em refratômetro do tipo ABBE (Analytik Jena[®], Jena, Alemanha) a 20 °C, segundo procedimento n.º 921.08 da A.O.A.C. (2000). A cor por comparação das cores das essências com as cores conhecidas e a aparência por comparação das essências no que diz respeito à sua transparência.

2.4 Avaliação da Atividade Antimicrobiana

Na realização dos testes da atividade antibacteriana foram utilizadas cinco culturas padrão, sendo três Gram-negativas *Escherichia coli* (ATCC 25923) e *Salmonella* Enteritidis (ATCC 12022) e *Aeromonas hydrophila* (INCQS 7966) e duas Gram-positivas *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644). As culturas estoque foram mantidas em Ágar Muller-Hinton inclinado sob refrigeração 8 °C (± 1 °C).

Para o preparo do inóculo, cultivou-se as colônias em ágar Muller-Hinton a 37 °C para *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* e *S. Enteritidis* e 28 °C para *A. hydrophila* por 24 horas. Foram preparados em solução salina (NaCl a 0,85% p/v) estéril a partir de culturas recentes, utilizando como padrão a concentração de 0,5 na escala de McFarland, a qual corresponde a um inóculo de aproximadamente 10^8 UFC/mL.

2.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A CIM do óleo essencial foi determinada utilizando o método de macrodiluição em caldo. Foram utilizados 5 mL de Caldo Muller-Hinton em tubos de ensaio duplamente concentrado acrescidos de 1 mL do inóculo das estirpes bacterianas e 4 mL das concentrações do óleo essencial que variaram de 0,3-160 $\mu\text{L/mL}$. Em seguida, o sistema foi incubado a 37

°C para *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* e *S. Enteritidis* e 28 °C para *A. hydrophila* por 24 horas, em aerobiose. Ao término do período de incubação, a mais baixa concentração do antimicrobiano que não apresentou crescimento microbiano visível foi considerada como a CIM. Após esta observação, alíquotas de 100 µL dos tubos que não apresentaram crescimento microbiano visível foram inoculadas em tubos de ensaio contendo ágar Muller-Hinton inclinado, por 24 horas a 37 ou 28 °C. A CBM foi considerada como a menor concentração do óleo essencial capaz de inibir o crescimento das espírites teste após incubação de 37 ou 28 °C por 24 horas. Como ensaios controle, foram utilizados sistemas sem adição de antimicrobianos (FU et al., 2007).

2.6 Avaliação da atividade do óleo essencial no queijo minas

A fim de avaliar o efeito do óleo essencial na inibição da microbiota da matriz alimentar, amostras de queijo minas frescal foram preparadas, baseada nos procedimento descrito por Piazzon-Gomes (2010) (Figura 1). Para isso, produziu-se cinco queijos minas frescal a partir de leite cru e sem conservantes, com a finalidade de obter um produto de alta carga microbiana para uma melhor visualização de uma possível ação antimicrobiana na matriz alimentar testada.

As concentrações do óleo essencial utilizadas na produção das amostras de queijo minas frescal foram (0,5%, 1%, 2% e 4%), para o controle dos testes microbiológicos, produziu-se um queijo sem adição de óleo essencial e conservante.

Nos períodos 0, 3, 6, 9, 12 e 15 dias de armazenamento, as amostras de queijo foram submetidas às análises de bactérias aeróbias mesófilas, contagem de colônias típicas de *Staphylococcus aureus*, enumeração de coliformes a 37 e 45 °C e pesquisa de *Salmonella* sp e *Listeria* sp., de acordo com os procedimentos descritos por Vanderzant e Spplittstoesser (1992).

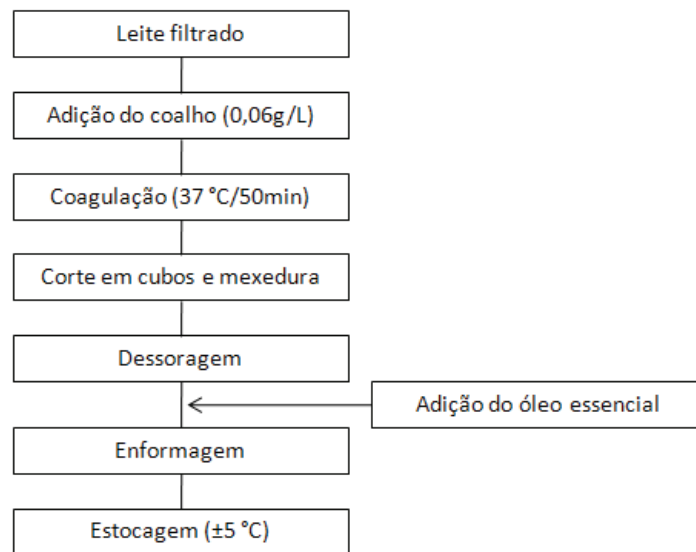


Figura 1 – Fluxograma de processamento do queijo minas frescal adicionado de óleo essencial.

3 Resultados

Os resultados referentes aos parâmetros físico-químicos e ao rendimento (%) do óleo essencial de *Croton rhamnifolioides* estão apresentados na Tabela 1. Para o índice de refração e densidade do óleo essencial os valores foram de 1,4444 e 0,8330, respectivamente. No que se refere à solubilidade em etanol a 90%, o óleo essencial foi solúvel a proporção de 1:1. A cor apresentada pelo óleo essencial foi considerada como sendo típica, ou seja, amarelo claro e aparência límpida.

O percentual de rendimento do óleo essencial obtido após duas horas de extração foi de 1,4% (v/m), tal resultado foi superior aos rendimentos obtidos por outras espécies de *Croton* (DOURADO; SILVEIRA, 2005; SILVA, 2008). Segundo Valmorbidia (2002) e Onofre (2008) o rendimento do óleo essencial de diferentes variedades de plantas é dependente da variação sazonal, localidade, solo, clima, época de colheita, método e tempo de destilação, além da diversidade genética da espécie.

Os resultados da atividade antibacteriana *in vitro* do óleo essencial das folhas de *Croton rhamnifolioides* estão apresentados na Tabela 2. As bactérias Gram-negativas *E. coli* e *S. Enteritidis* demonstraram maior resistência ao óleo essencial, sendo encontrado um valor de

CIM de 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ e CBM de 40 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para ambas as bactérias. *L. monocytogenes* apresentou maior sensibilidade ao óleo com CIM de 2,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, seguido de *S. aureus* (5 $\mu\text{L}/\text{mL}$).

Alguns autores, levando em consideração a característica lipofílica dos óleos essenciais e as diferenças na membrana celular das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sugerem que as bactérias Gram-positivas são ligeiramente mais sensíveis aos óleos que as Gram-negativas. De fato, a membrana externa das bactérias Gram-negativas, por possuir uma camada fosfolipídica mais fina, torna sua superfície altamente hidrofílica, enquanto que a presença de uma bi-camada fosfolipídica na membrana celular das bactérias Gram-positivas, possibilita a passagem com maior facilidade de compostos hidrofóbicos (DORMAN; DEANS, 2000; BAGAMBOULA et al., 2004).

O efeito do óleo essencial de *C. rhamnifolioides* em diferentes concentrações (0,5%, 1%, 2% e 4%), escolhidas com base nos valores de CIM anteriormente encontrados, foi avaliado sobre as bactérias contaminantes do queijo minas frescal em um período de 15 dias de armazenamento sob refrigeração.

Verificou-se um destacável efeito inibitório do óleo essencial de *C. rhamnifolioides* sobre a taxa de crescimento das bactérias aeróbias mesófilas no substrato ensaiado (Figura 2), quando utilizado as concentrações de 0,5 e 1%. Na concentração a 2% houve redução gradual do crescimento bacteriano ao longo do período avaliado e a 4% ocorreu uma redução de 4 ciclos logarítmicos após o terceiro dia com relação a carga inicial, ou seja, uma redução em torno de 10000 vezes. Embora os queijos analisados tenham apresentado alta carga microbiana no tempo zero, nota-se que o óleo essencial exerceu um efeito inibitório interessante sobre a carga microbiana. Estas contagens elevadas podem ser relacionadas ao uso do leite cru como matéria-prima para a preparação dos queijos utilizados como modelo alimentar.

O óleo essencial de *C. rhamnifolioides* a 1% não reduziu a contagem de *S. aureus* presente na amostra, entretanto diminuiu a taxa de aceleração de crescimento deste micro-organismo em relação ao grupo controle (Figura 3). Para as concentrações 2 e 4% houve redução total da carga microbiana, evidenciando um efeito bactericida.

Na tabela 1 observa-se que, para o grupo coliformes a 37 °C, a redução do crescimento só ocorreu a partir da concentração a 2% após o sexto dia, no entanto quando utilizado 1% os resultados são sempre mantidos abaixo em comparação ao controle. Para coliformes a 45 °C observa-se redução na velocidade de crescimento na concentração 0,5%, evidência de um

efeito bacteriostático a 1% e bactericida a 2 e 4%. Foi verificado ausência de *Listeria* sp. e *Salmonella* sp. em todas as amostras analisadas.

Smith-Palmer, Stewart e Fyfe (2001) testaram óleos essenciais de louro, cravo, tomilho e canela contra *L. monocytogenes* e *Salmonella enteritidis* em queijo com baixo (16%) ou alto (30%) teor de lipídios. Os autores observaram que a composição do queijo mostrou ser um fator interessante na atividade exercida pelos óleos essenciais, uma vez que foram mais eficientes na inibição desses patógenos no queijo com baixo teor de gordura. Trajano et al. (2010) avaliando amostras de queijo de coalho embaladas a vácuo e adicionadas de 5, 10 e 20 µg/g do óleo essencial de *Eugenia caryophyllata*, observaram uma redução na taxa de crescimento de bactérias mesófilas ao longo de 15 dias de armazenamento sob refrigeração.

Mendonça (2004) ao avaliar ricota adicionada de 1% de óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), verificou inibição significativa no crescimento de *Staphylococcus aureus*, com redução de 4,27 ciclos logarítmicos quando comparada ao crescimento de *S. aureus* em ricota sem adição de óleo. Alarcon (2007) avaliando os óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare*) e pimenta do reino preta (*Piper nigrum* L), quanto a sua capacidade em inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* em ricota, observou que quando adicionado 1% de óleo essencial de orégano houve redução de 3,36 e 1,88 ciclos logarítmicos na população de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, respectivamente. Quando utilizado 5% de óleo de pimenta do reino, o número de *S. aureus* e *E. coli* foi reduzido em 1,39 e 1,17 ciclos logarítmicos, respectivamente.

Tanto as propriedades intrínsecas do alimento (conteúdo de proteínas, conteúdo de lipídeos, atividade de água, presença de antioxidantes, pH, conteúdo de sal), como os determinantes extrínsecos (temperatura de armazenamento, embalagem, características dos micro-organismos), podem influenciar na eficácia antimicrobiana de óleos essenciais e na conduta dos micro-organismos no alimento (BURT, 2004; GONZÁLES-MONTALVO et al., 2007).

Mesmo encontrando resultados satisfatórios para o efeito inibitório do óleo essencial *C. rhamnifolioides* quando aplicado ao modelo alimentar neste estudo, vale ressaltar que, inúmeros estudos relataram que a eficiência *in vitro* dos antimicrobianos é significativamente diminuída quando testados em modelo alimentar (ROLLER; COVILL, 2000; POL et al., 2001; LEUSCHNER; ZAMPARINI, 2002). A maior disponibilidade de nutrientes em alimentos em relação aos meios de laboratório, podem permitir que as bactérias reparem as células danificadas mais rápido (GILL et al., 2002). Além disso, a presença de lipídios,

carboidratos, proteínas, sal e teor de água reduzido dos meios laboratoriais, em comparação aos alimentos, sabidamente influenciam a atividade antimicrobiana. Gutierriz, Barry e Bourke (2008) sugerem que os lipídios presentes nos alimentos absorvem os componentes dos óleos essenciais, diminuindo assim a concentração na fase aquosa e, portanto, o efeito antimicrobiano. O teor de proteína dos alimentos também pode ser um fator que influencia a eficácia antimicrobiana, uma vez que podem ser envolvidos em reações de complexação com compostos fenólicos presentes nos óleos. Esta complexação ocorre via ligações de hidrogênio entre os grupos fenólicos e ligações peptídicas e via interações hidrofóbicas (SMITH-PALMER, STEWART, FYFE, 2001).

Em meios de cultura como sistemas alimentares, Gutierriz, Barry e Bourke (2008 e 2009) investigaram a influência de diferentes componentes químicos sobre a ação antimicrobiana de diversos óleos aplicados isoladamente ou combinados, sendo que os óleos essenciais foram mais eficientes frente a bactérias patogênicas quando aplicados em meios com elevado teor de proteína e alta acidez. Por outro lado, verificou-se necessitar de menores teores de gorduras e carboidratos bem como níveis moderados de açúcares simples.

4 Conclusão

Os resultados obtidos para o desempenho antimicrobiano do óleo essencial de *C. rhamnifolioides* estudado no modelo alimentar, confirmam o seu potencial antibacteriano observado *in vitro*, uma vez que houve inibição do crescimento bacteriano nas concentrações 1 e 2% quando comparados aos ensaios controle, e ausência de crescimento no ensaio a 4% a partir do terceiro dia. No entanto, há a necessidade de detalhamento para os aspectos de toxicidade do óleo essencial e sensorial do produto, no sentido de adequar a concentração de óleo essencial que não deprecie a característica sensorial do alimento e exerça a sua propriedade antimicrobiana.

Agradecimento

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

- ALARCON, M. M. V. **Efeito inibitório dos óleos essenciais no crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* em queijo ricota.** Lavras, 2008, 56p. Dissertação (Mestre em Ciência dos Alimentos), Universidade Federal de Lavras (UFLA).
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. Official methods of analysis. 17^a. edição. Washington: Arlington, 2000.
- BAGAMBOULA, C.F.; UYTTENDAELE, M.; CANDAN, F.; DAFERERA, D.; UNLI, G.V.; POLISSIOU, M.; SOKMEN, A. Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *S. cryptantha* (Montbret et Aucher ex Benth.) and *S.multicaulis* (Vahl.) **Food Chemistry**, v. 84, n. 4, p. 519-525, 2004.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.
- DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 2, p. 308-316, 2000.
- DOURADO, R. C. M.; SILVEIRA, E. R. Preliminary investigation on the volatile constituents of *Croton sonderianus* Muell. Arg.: Habitat, plant part and harvest time variation. **Journal of Essential Oil Research**, v. 17, n. 1, p. 36-40. 2005.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4^a. edição. São Paulo: Atheneu, 1988.
- FARMACOPÉIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA. 2^a. edição. São Paulo: Andrei, 1997.
- FRIEDMAN, M.; HENIKA, P. R.; MANDRELL, R. E. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 10, p. 1545-1560, 2002.
- FU, Y.; ZU, Y. G.; CHEN, L. Y.; SHI, X. G.; WANG, Z., SUN, S. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 10, p. 989–994, 2007.
- GILL, A.; DELAQUIS, P.; RUSSO, P.; HOLLEY, R. Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. **International Journal Food Microbiology**, v. 73, n. 1, p. 83–92, 2002.
- GONZÁLEZ-MONTALVO, B.; CAPITA, R.; GUEVARA-FRANCO, J. A.; PRIETO, M.; ALONSO-CALLEJA, C. Influence of oxygen exclusion and temperature on pathogenic bacteria levels and sensory characteristics of packed ostrich steaks throughout refrigerated storage. **Meat Science**, v. 76, n. 2, p. 201-209, 2007.

GUTIERREZ, J. BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. **International Journal of Food Microbiology**, v. 124, n. 1, p. 91-97, 2008.

GUTIERREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: efficacy, synergistic potential and interactions with food components. **Food Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 142-150, 2009.

KOTZEKIDOU, P.; GIANNAKIDIS, P.; BOULAMATIS, A. Antimicrobial activity of some plant extracts and essential oils against foodborne pathogens in vitro and the fate of inoculated pathogens in chocolate. **LTW – Food Science and Technology**, v. 41, n. 1, p. 119-127, 2007.

LEUSCHNER, R.G.K.; ZAMPARINI, J. Effects of spices on growth and survival of *Escherichia coli* 0157 and *Salmonella enterica* serovar *enteridis* in broth model systems and mayonnaise. **Food Control**, v.13, n.6-7, p.399-404, 2002.

MENDONÇA, A. T. **Efeito dos óleos essenciais de condimentos sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* em ricota cremosa**. Lavras, 2004, 72p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Lavras (UFLA).

MOREIRA, M. R.; PONCE, A. G.; VALLE, C. E.; ROURA, S. I. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. **Food Science and Technology**, v. 38, n. 5 , p. 565-570, 2005.

ONOFRE, S.B.; FABIANE, K.C.; FERRONATTO, R.; SANTOS, A.C. Physicochemical characteristics of the essential oils of *Baccharis dracunculifolia* and *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 197-203, 2008.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* 0157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 414-420, 2007.

PEREIRA, A. A.; CARDOSO, M. G.; ABREU, L. R.; MORAIS, A. R.; GUIMARÃES, L. G. L.; SALGADO, A. P. S. P. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 3 , p. 887-893, 2008.

PIAZZON-GOMES, J.; PRUDÊNCIO, S. H.; SILVA, R. S. R. F. Queijo tipo minas frescal com derivados de soja: características físicas, químicas e sensoriais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 77-85, 2010.

POL, L.E.; MASTWIJK, H.C.; SLUMP, R.A.; POPA, M.E.; SMID, E.J. Influence of food matrix on inactivation of *Bacillus cereus* by combinations of nisin, pulsed electric fields treatment and carvacrol. **Journal of Food Protection**, v.64, n.7, p.1012-1018, 2001.

RANDAU, K. P, FLORÊNCIO, D. C., FERREIRA, C.P., XAVIER, H. S. Estudo farmacognóstico de *Croton rhamnifolius* H.B.K. e *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.14, n. 2, p. 89-96, 2004.

ROLLER, S.; COVILL, N. The fungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. **International Journal of Food Microbiology**, v.47, n.1-2, p.67-77, 2000.

SILVA, F. K. S. **Contribuição ao Estudo Fitoquímico de *Croton rhamnifolius* (Euphorbiaceae)**. Fortaleza, 2008. 162p. Dissertação (Mestre em Química Orgânica). Universidade Federal do Ceará (UFC).

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. **Food Microbiology**, v. 18, n. 4, p. 463-470, 2001.

SOUZA, E.L; STAMFORD, T.L.M.; LIMA, E.O.; TRAJANO, V.N.; FILHO, J.M.B. Antimicrobial effectiveness of spices: an approach for use in food consevation systems. **Brazilian Arquivos of Biology and Technology**, v. 48, n. 4, p. 549-558, 2005.

TRAJANO, V. N.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L.; TRAVASSOS, A. E. R. Inhibitory effect of the essential oil from *Eugenia caryophyllata* Thumb leaves on coalho cheese contaminating microorganisms. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 4, p. 1001-1006, 2010.

VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D.F. **Compendium for the Microbiological Examination of Foods**. 3^a. edição. Washington: Public Health Association, 1992.

VALMORBIDA, J.; BOARO, C.F.S.; MARQUES, M.O.M.; FERRI, A.F. Rendimento e composição química de óleos essenciais de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes concentrações de potássio. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 8, n.4 , p. 56-61, 2006.

Tabela 1 – Índices físico-químicos e percentual de rendimento do óleo essencial de *Croton rhamnifolioides*.

Índices físico-químicos	Óleo essencial de <i>Croton rhamnifolioides</i>
Índice de refração $^{20}_{nd}$	1,4444
Densidade $^{20}_{d_{20}}$	0,8330
Solubilidade em álcool (v/v)	1:1
Cor	Amarelo claro
Aparência	Límpido
Rendimento (%)	1,40

Tabela 2 – Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima do óleo essencial de *Croton rhamnifolioides* frente a bactérias patogênicas de interesse em alimentos.

Bactérias testadas	CIM ($\mu\text{L/ml}$)	CBM($\mu\text{L/ml}$)	Viabilidade da estirpe*
Gram-positivas			
<i>Listeria monocytogenes</i>	2,5	5	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	5	10	+
Gram-negativas			
<i>Aeromonas hydrophila</i>	10	20	+
<i>Escherichia coli</i>	20	40	+
<i>Salmonella</i> Enteritidis	20	40	+

*Capacidade de crescimento das bactérias sem adição de óleo essencial

Tabela 3 - Efeito da adição de óleo essencial de *Croton rhamnifolioides* em queijo minas frescal sobre Coliformes a 37 e 45 °C.

	Tempo (dias)	Concentrações				
		0,5%	1%	2%	4%	Controle
Coliformes a 37 °C (NMP/g)	0	2400	75	39	20	2400
	3	2400	460	150	3	2400
	6	460	210	150	3	2400
	9	150	210	28	3	2400
	12	2400	460	20	3	2400
	15	2400	460	11	3	2400
Coliformes a 45 °C (NMP/g)	0	28	20	7	3	28
	3	28	28	4	3	75
	6	20	23	3	3	75
	9	21	75	3	3	150
	12	43	23	3	3	210
	15	75	28	3	3	210

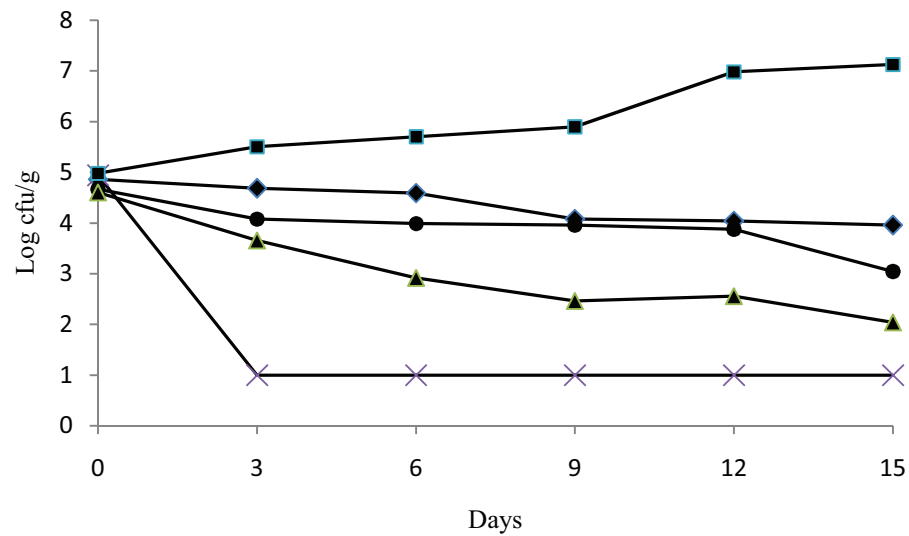


Figura 2 – Efeito da adição do óleo essencial de *Croton rhamnifolioides* em queijo minas frescal sobre o número de bactérias aeróbias mesófilas: (■) Controle (0 $\mu\text{L/g}$); (◆) 0,5% - 5 $\mu\text{L/g}$; (●); 1% - 10 $\mu\text{L/g}$; (▲) 2% - 20 $\mu\text{L/g}$; (×) 4% - 40 $\mu\text{L/g}$.

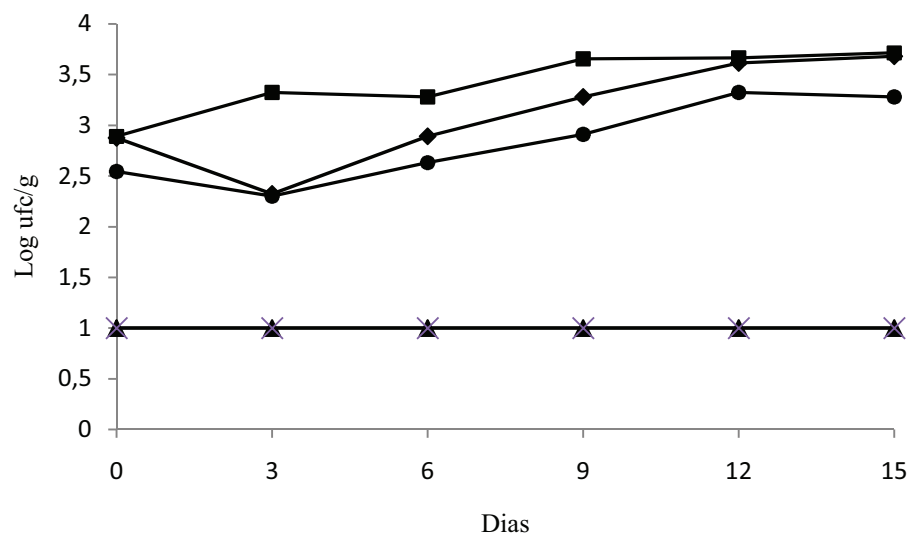


Figura 3 – Efeito da adição do óleo essencial de *Croton rhamnifolioides* em queijo minas frescal sobre a contagem de colônias típicas de *Staphylococcus aureus*: (■) Controle (0 $\mu\text{L/g}$); (◆) 0,5% - 5 $\mu\text{L/g}$; (●); 1% - 10 $\mu\text{L/g}$; (▲) 2% - 20 $\mu\text{L/g}$; (×) 4% - 40 $\mu\text{L/g}$.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo pode-se verificar que:

- O rendimento do óleo essencial de *C. rhamnifolioides*, obtido pelo processo de hidrodestilação, foi de 1,40, resultado este superior aos encontrados na literatura.
- Na análise da composição do óleo essencial de *C. rhamnifolioides* observou-se o 1,8-cineol como composto majoritário.
- Nos ensaios *in vitro*, o óleo essencial de *C. rhamnifolioides* apresentou ação bacteriostática e bactericida, para todas as bactérias utilizadas como micro-organismos testes, de modo que as cepas Gram-positivas apresentaram um comportamento de maior sensibilidade ao óleo essencial ensaiado.
- Os valores de CIM e CIM /2, determinados através da técnica de macrodiluição, foram capazes de inibir a viabilidade de todas as estirpes ensaiadas ao longo de 12 horas.
- O óleo essencial de *C. rhamnifolioides* mostrou uma considerável propriedade de inibição da microbiota das amostras de queijo minas frescal, armazenadas sob refrigeração, quando utilizado concentrações superiores a 1%.

REFERÊNCIAS

- AKINEDEN, Ö.; ABDULWAHED, A. H.; SCHNEIDER, E.; USLEBER, E. Enterotoxigenic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from goats' milk cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 124, n. 2, p. 211-216, 2008.
- ALARCÓN, M.M.V. **Efeito inibitório dos óleos essenciais no crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* em queijo ricota**. 2007.56f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.
- ALMEIDA, A. B. A., MELO, P. S., LIMA, C. A. H., GRACIOSO, J. S., CARLI, L., NUNES, D. S., HAUN, M., BRITO, A. R. M. Antiulcerogenic effect and cytotoxic activity of semi-synthetic croton in obtained from *Croton cajucara* Benth. **European Journal of Pharmacology**, v. 472, n. 11, p. 205-212, 2003.
- ANANG, D. M.; RUSUL, G.; BAKAR, J.; LING, F. H. Effects of lactic acid and lauricidin on the survival of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* O157:H7 in chicken breast stored at 4 °C. **Food Control**, v. 18, n. 8, p. 961-969, 2007.
- ARAGON-ALEGRO, L.C.; ARAGON, D.C.; MARTINEZ, E.Z.; LANDGRAF, M.; GOMBOSSY DE MELO FRANCO, B.D.; DESTRO, M.T. Performance of a chromogenic medium for the isolation of *Listeria monocytogenes* in food. **Food Control**, v.19, n.5, p.483-486, 2008.
- ARIDOGAN, B. C.; BAYDAR, H.; KAYA, S.; DEMIRCY, M.; OZBASAR, D.; MUMCU, E. Antimicrobial activity and chemical composition of some assential oils. **Archives Pharmacal Research**, v. 25, n. 6, p. 860-864, 2002.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. Official methods of analysis. 17.ed. Washington: Arlington, 2000.
- BAGAMBOULA, C.F.; UYTENDAELE, M.; CANDAN, F.; DAFERERA, D.; UNLI, G.V.; POLISSIOU, M.; SOKMEN, A. Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *S. cryptantha* (Montbret et Aucher ex Benth.) and *S.multicaulis* (Vahl.) **Food Chemistry**, v. 84, n. 4, p. 519-525, 2004.
- BAKKALI F, AVERBECK S, AVERBECK D, IDAOMAR M. Biological effects of essential oils – A review. **Food Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2 , p. 446-475, 2008.
- BANDONI, A. L.; CZEPACK, M. P. Os recursos vegetais aromáticos no Brasil: seu aproveitamento industrial para a produção de aromas e sabores. 1 ed. Vitória: EDUFES, 2008.
- BARBOSA-FILHO, J. M.; MEDEIROS, K. C. P.; DINIZ, M. F. F. M.; BATISTA, L. M.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; SILVA, M. S.; CUNHA, E. V. L.; ALMEIDA, J. R. G. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. **Revista Brasileira de Farmacognosia** v.16, n.2, p. 258-285, 2006.

BARDHAN, P. K., ALBERT, M.J.; ALAM, N.H.; FARUQUE, S.M.; NEOGI, P.K.B; MAHALANABIS, D. Small bowel and fecal microbiology in children suffering from persistent diarrhea in Bangladesh. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v.26, n. 1, p.9-15, 1998.

BARROS, F. M. C. **Variabilidade sazonal, atividade antimicrobiana, fracionamento bio-guiado, isolamento e elucidção estrutural dos principais constituintes do óleo essencial de Lippia Alba (MILL.) N. E. Brown**. 2008. 162p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Santa Maria, Porto Alegre.

BARROS, J.C.; CONCEIÇÃO, M.L.; GOMES NETO, N.J.; COSTA, A.C.V.; SIQUEIRA JÚNIOR, J.P.; BASÍLIO JÚNIOR, I.D.; SOUZA, E.L. Interference of *Origanum vulgare* L. essential oil on the growth and some physiological characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. **LWT- Food Science and Technology**, v. 42, n. 6 , p. 1139-1143, 2009.

BARROS, M.A.F.; NERO, L.A.; SILVA, L.C.; D'OVIDIO, L.; MONTEIRO, F.A.; TAMANINI, R.; FAGNANI, R.; HOFER, E.; BELOTI, V. *Listeria monocytogenes*: occurrence in beef and identification of the main contamination points in processing plants. **Meat Science**, v.76, n.4, p.591-596, 2007.

BAUER, A.W.M.M.; KIRBY, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.45, n.3, p. 493-496, 1966.

BAYLES, D. O. Changes in heat resistance resulting from pH and nutritional shifts of acid-adapted and non-acid-adapted *Listeria monocytogenes* Scott A. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 2, p. 316-321, 2004.

BEAZ-HIDALGO, R.; ALPERI, A.; FIGUERAS, M. J.; ROMALDE, J. L. *Aeromonas piscicola* sp. nov., isolated from diseased fish. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 32, n. 7, p. 471-479, 2009.

BELÉM, L. F. **Estudo epidemiológico da pitiríase versicolor no Estado da Paraíba e avaliação química e antifúngica de produtos naturais e sintéticos contra seu agente etiológico**. 2001. 167f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2001.

BEN ARFA, A.; COMBES, S.; PREZIOSI-BELLOY, L.; GONTARD, N.; CHALIER, P. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 149-154, 2006.

BENKEBLIA, N. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technology**, v. 37, n. 2 , p. 263-268, 2004.

BERRY, P.E.; HIPPI, A.L.; WURDACK, K. J.; VAN EE, B.; RIINA, R. Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe Crotonaeae (Euphorbiaceae sensu stricto) using ITS and trnL-trnF sequence data. **American Journal of Botany**, v. 92, n. 9, p. 1520-1534, 2005.

BLAZZI, E. **O maravilhoso poder das plantas**. 18. ed. São Paulo: Casa Publicadora Brasileira, 2004.

BORGES, M.F.; NASSU, R.T.; PEREIRA, J.L.; ANDRADE, A.P.C.; KUAYE, A.Y. Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo coalho. **Ciência Rural**, v. 38, n. 5, p. 1431-1438, 2008.

BOYNUKARA, B.; GULHAN, T.; ALISARLI, M.; GURTURK, K.; SOLMAZ, H. Classical enterotoxigenic characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine subclinical mastitis in Van, Turkey. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, n. 2, p. 209-211, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de queijo minas frescal. Portaria n°352. **Diário Oficial da União**, Brasília: 08 set. 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Resolução – RDC n°12 de 2 de janeiro de 2001. **Diário Oficial da União**, Brasília: 02 jan. 2001.

BRENNER, D.J.; KRIEG, N.R.; STALEY, J.T. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2. ed. New York: Springer, 2005.

BRUL,S.; COOTE,P. Preservative agents in foods: Mode of action and microbial resistance mechanisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, n. 1-2 , p.1-17, 1999.

BULHÕES, C. C. C.; ROSSI JUNIOR, O. D. Occurrence of the genus *Aeromonas* in minas frescal cheese. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.54, n. 3, p.320-324, 2002.

BURITI, F.C.A.; ROCHA, J.S.; SAAD, S.M.I. Incorporation of *Lactobacil us acidophilus* in Minas fresh cheese and implicatons for textural and sensorial properties during storage. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 12, p. 1279-1288, 2005.

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

BUSATTA, C.; VIDAL, R. S.; POPIOLSKI, A. S.; MOSSI, A. J.; DARIVA, C.; RODRIGUES, M. R. A.; CORAZZA, F. C.; CORAZZA, M. L.; VLADIMIR, J.; CANSIAN, R. L. Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. **Food Microbiology**, v. 25, n. 1, p.207–211, 2008.

CAMPOS, D.C. **Queijo: breve histórico e principais características**. 11. ed. Piracicaba: ESALQ; NAPMA, 2001.

CAPRIOLI, A.; MORABITO, S.; BRUGERE, H.; OSWALD, E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. **Veterinary Research**, v.36, n.3, p.289-311, 2005.

CARDOSO, M.G.; SHAN, A.Y.K.V.; SOUZA, J.A. **Fitoquímica e química de produtos naturais**. Lavras: UFLA, 2001.

CAREAGA, M.; FERNANDEZ, E.; DORANTES, L.; MOTA, L.; JARAMILLO, M. E.; HERNANDEZ-SANCHEZ, Z. H. Antibacterial activity of Capsicum extract against *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa* inoculated in raw beefmeat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, n. 3, p. 331-335, 2003.

CARSON C. F.; MEE, B. J.; RILEY, T. V. Mechanism of action of *Malaleuca artemifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 6, p. 1914-1920, 2002.

CARVALHO, J. D. G.; VIOTTO, W. H.; KUAYE, A. Y. 2007. The quality of Minas Frescal cheese produced by different technological processes. **Food Control**, v.18, n. 3, p. 262-267, 2007.

CASTILLA, K. S, ASTOLFI, F. C. S., MICKE, M. A., APARECIDA, N. I., F. A. J. Distribution of virulence genes *sefC*, *pefA* and *spvC* in *Salmonella* Enteritidis phage type 4 strains isolated in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n.2, p. 135-139, 2006.

CASTRO-ESCARPULLI, F.; FIGUERAS, M.J.; AGUILERA-ARREOLA, G.; SOLER, L.; FERNANDEZ-RENDON, E.; APARÍCIO, G.O; GUARRO, J.; CHACON, M.R. Characterisation of *Aeromonas* spp. isolated from frozen fish intended for human consumption in México. **International Journal Food Microbiology**, v. 84, n. 1, p. 41– 49, 2003.

CATAO, R.M.R.; CEBALLOS, B.S.O. *Listeria* spp., coliformes totais e fecais e *E.coli* no leite cru pasteurizado de uma industria de laticínios, no Estado da Paraíba (Brasil). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 3, p. 281-287, 2001.

COSTA, F. N.; ROSSI JÚNIOR, O. D. Bactérias do gênero *Aeromonas* em abatedouro de frangos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n. 5, p. 534-535, 2002.

COX, S. D., MANN, J. L., BELL, H. C., GUSTAFSON, J. E., WARMINGTN, J. R., WYLLIC, S. G. The mode of antimicrobial action of the essential oils of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal Applied Microbiology**, v. 88, n. 1, p.170–175, 2000.

CRAVEIRO, A. A.; MATOS, F. J.; ALENCAR, J. W. Óleos essenciais na produção industrial. **Revista Química Industrial**. v. 19, p. 60-64, 1989.

CRISTANI, M. T.; D'ARRIGO, M.; MANDALARI, G.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, M. G.; VENUTI, V.; BISIGNANO, G.; SAIJA, A.; TROMBETTA, D. Interaction of Four Monoterpenes Contained in Essential Oils with Model Membranes: Implications for Their Antibacterial Activity. **Journal of Agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 15, p. 6300-6308, 2007.

CUNHA NETO, A.; SILVA, C.G.M.; STAMFORD, T.L.M. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos *in natura* e processados no Estado de Pernambuco, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 3, p. 263-271, 2002.

DAFERERA, D.J.; ZIOGAS, B.N.; POLISSIOU, M.G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Crop Protection**, v. 22, p. 39-44, 2003.

DASKALOV, H. The importance of *Aeromonas hydrophila* in food safety. **Food Control**, v. 17, n. 6, p. 474-483, 2006.

DELAMARE, A. P. L.; COSTA, S. O. P.; DA SILVEIRA, M. M.; ESHEVERRIGARAY, S. Growth of *Aeromonas* species on increasing concentrations of sodium chloride. **Letter Applied Microbiology**, v.30, n. 1, p. 57-60, 2000.

DENNY, J.; MCLAUCHLIN, J. Human *Listeria monocytogenes* infections in Europe - an opportunity for improved European surveillance. **Eurosurveillance**, v.13, n.13, p. 80-82, 2008.

DESTRO, M. T. Incidence and significance of *Listeria* in fish and fish products from Latin America. **International Journal of Food Microbiology**, v. 62, n. 3, p. 191-196, 2000.

DICKEL, E. L. **Utilização da microbiologia convencional, reação em cadeia pela polimerase (PCR) e ensaio imunoenzimático (ELISA) no monitoramento de *Salmonella* em carcaças de frango para o controle higiênico-sanitário do processo de abate.** 2004, 133f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

DJENANE, D.; YANGÜELA, J.; MONTAÑÉS L.; DJERBAL, M.; RONCALÉS, P. Antimicrobial activity of Pistacia lentiscus and Satureja montana essential oils against *Listeria monocytogenes* CECT 935 using laboratory media: Efficacy and synergistic potential in minced beef. **Food Control**, v. 22, n. 7, p. 1046-1053, 2011.

DORES, R.G.; CASALI, V.W.D.; FINGER, F.L.; CECON, P.R. Essential oil changes in capsules of carqueja Baccharis genistelloides (Lam.) Pers. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, p. 175-179, 2006.

DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 2, p. 308-316, 2000.

DOURADO, R. C. M.; SILVEIRA, E. R.. Preliminary investigation on the volatile constituents of *Croton sonderianus* Muell. Arg.: Habitat, plant part and harvest time variation, **Journal of Essential Oil Research**, v. 17, n. 1, 36-40. 2005.

DOWNES, F. P.; ITO, K. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4 ed. Washington: APHA, 2001.

DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R., eds. **Food microbiology: fundamentals and frontiers.** 3. ed. Washington: ASM Press, 2007.

DRUTZ, D. J. *In vitro* antifungal susceptibility testing and measurement of levels of antifungal agents in body fluids. **Review in Infectious Diseases**. v.9, n.2, p. 392-397, 1987.

EFSA . Community summary report, food-borne outbreaks in the European Union in 2007. **The EFSA Journal**, v. 271, p. 1–128, 2009.

EVRENDILEK, G. A.; BALASUBRAMANIAM, V. M. Inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in yogurt drink applying combination of high pressure processing and mint essential oils. **Food Control**, v. 22, n. 8, p. 1435-1441, 2011.

FALCÃO, H. S.; LIMA, I. O.; SANTOS, V. L.; DANTAS, H. F.; DINIZ, M. F. F. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BATISTA, L. M. Review of the plants with anti-inflammatory activity studied in Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia** v.15, n.4, p. 381-391, 2005. FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FARMACOPÉIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA. 2. ed. São Paulo: Andrei, 1997.

FERNANDES, S.A.; TAVECHIO, A.T.; GHILARDI, A.C.; DIAS, A.M.; ALMEIDA, I.A.; MELO, L.C. *Salmonella* serovars isolated from humans in Sao Paulo State, Brazil, 1996-2003. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.48, n.4, p.179-184, 2006.

FIGUERAS, M. J.; ALPERI, A.; BEAZ-HIDALGO, R.; STACKEBRANDT, E.; BRAMBILLA, E.; MONERA, A.; MARTINEZ-MURCIA, A. J. *Aeromonas rivuli* sp. nov., isolated from the upstream region of a karst water rivulet in Germany. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 242-248, 2010.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer?. **Trend in Food Science &Tecnology**, v. 19, n. 3, p. 156-164, 2008.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da segurança alimentar**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.

FRANCO, L.L.; **As sensacionais 50 plantas medicinais: campeões de poder curativo**, 5. ed. Curitiba: Lobo Franco Ltda, 2000.

FRAZIER, W. C.; WESTHOFF, D. C. **Microbiologia de los Alimentos**. Zaragoza: Acribia, 2000.

FREITAS, A. C. Occurrence and characterization of *Aeromonas* species in pasteurized milk and white cheese. **Journal of Food Protection**, v. 56, n. 1, p. 62-65, 1993.

FREO, J.D.; REOLON, J. Qualidade dos produtos derivados de carne e leite, industrializados pelas agroindústrias de Frederico Westphalen, RS. **Higiene Alimentar**, v. 20, n. 140, p. 53-59, 2006.

FRIEDMAN, M.; HENIKA, P. R.; MANDRELL, R. E. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 10, p. 1545-1560, 2002.

- FRÖDER, H. **Emprego de um método molecular para avaliar a presença de *Listeria monocytogenes* em saladas de hortaliças folhosas minimamente processadas.** 2005. 93f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- FU, Y., ZU, Y. G., CHEN, L. Y., SHI, X. G., WANG, Z., SUN, S. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 10, p. 989–994, 2007.
- FUEYO, J. M.; MENDONZA, M. C.; ALVAREZ, M. A.; MARTÍN, M. C. Relationships between toxin gene content and genetic background in nasal carried isolates of *Staphylococcus aureus* from Asturias, Spain. **FEMS Microbiology Letters**, v. 243, n. 2 ,p. 447-454, 2005.
- FURTADO, M.M. **Principais problemas dos queijos: causas e prevenção.** Edição Revisada e Ampliada. São Paulo: Fonte Comunicação e Editora. 2005.
- GANDHI, M.; CHIKINDAS, M. L.** *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. **International Journal of Food Microbiology**, v. 113, n. 1, p. 1-15, 2007.
- GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos.** São Paulo: Livraria Varela, 2008.
- GILL, A.; DELAQUIS, P.; RUSSO, P.; HOLLEY, R. . Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. **International Journal Food Microbiology**, v. 73, p. 83–92, 2002.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p.374-381, 2007.
- GONZÁLEZ-MONTALVO, B.; CAPITA, R.; GUEVARA-FRANCO, J. A.; PRIETO, M.; ALONSO-CALLEJA, C. Influence of oxygen exclusion and temperature on pathogenic bacteria levels and sensory characteristics of packed ostrich steaks throughout refrigerated storage. **Meat Science**, v. 76, n. 2, p. 201-209, 2007.
- GOULET, V.; HEDBERG, C.; LE MONNIER, A.; DE VALK, H. Increasing incidence of listeriosis in France and other European countries. **Emerging Infectious Diseases**, v.14, n.5, p.734-740, 2008.
- GOVAERTS, R.; FRODIN, D. G. & RADCLIFFE-SMITH, A. **World Checklist and bibliography of Euphorbiaceae (and Pandaceae.)** 2. ed. Royal Botanic Gardens Kew, London. 2000.
- GOVARIS, A.; SOLOMAKOS, N.; PEXARA, A.; CHATZOPOULOU, P. S. The antimicrobial effect of oregano essential oil, nisin and their combination against *Salmonella* Enteritidis in minced sheep meat during refrigerated storage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, n, 2-3, p. 174-180, 2010.
- GRIMONT, P.A.D.; WEILL, F. **Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars.** 9.ed. Paris: Institut Pasteur, 2007.

GUNDUZ, G. T.; GONUL, S. A.; KARAPINAR, M. Efficacy of oregano oil in the inactivation of *Salmonella typhimurium* on lettuce. **Food Control**, v. 21, n. 4, p. 513–517, 2010.

GUTIERREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. **International Journal of Food Microbiology**, v. 124, n. 1, p. 91–97, 2008.

GYLES, C.L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. **Journal of Animal Science**, v.85, n.13, p. 45-62, 2007.

HARPAZ, S.; GLATMAN, L.; DRABKIN, V.; GELMAN, A. Effects of herbal essential oils used to extend the shelf life of freshwaterreared Asian sea bass fish (*Lates calcarifer*). **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 3, p. 410-417, 2003.

HAYES, S. L.; RODGERS, M. R.; LYE, D. J.; STELMA, G. N.; MCKINSTRY, C. A.; MALARD, J. M.; VESPER, S. J. Evaluating virulence of waterborne and clinical *Aeromonas* isolates using gene expression and mortality in neonatal mice followed by assessing cell culture's ability to predict virulence base don transcriptional response. **Journal Applied Microbiology**, v. 103, n. 4, p. 811-820, 2007.

HEDBERG, I.; HEDBRERG, O.; MADATI, P. J.; MSHIGENI, K. E.; MSHIU, E. N.; SAMUELSSON, G. Inventory of plants used in traditional medicine in Tanzania. II. Plants of the families Dilleniaceae-Opiliaceae. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 9, n.1, p. 105-127, 1983.

HIRAMATSU, R.; MATSUMOTO, M.; SAKAE, K.; MIYAZAKI Y. Ability of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. to survive in a desiccation model system and in dry foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 11, p.6657-6663, 2005.

HOLLEY, R. A.; PATEL, A. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials- review. **Food Microbiology**, v. 22, n. 4, p. 273-292, 2003.

HUGHES, C.; GILLESPIE, I.A.; O'BRIEN, S.J. Foodborne transmission of infectious intestinal disease in England and Wales, 1992-2003. **Food Control**, v.18, n.7, p.766-772, 2007.

ISONHOOD, J.H.;DRAKE, M. *Aeromonas* species in foods. **Journal Food Protection**, v.65, n.3, p. 575-82, 2002.

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

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

JORGENSEN, H. J.; MATHISEN, T.; LØVSETH, A.; OMOE, K.; QVALE, K. S.; LONCAREVIC, S. An outbreak of staphylococcal food poisoning caused by enterotoxin H in mashed potato made with raw milk. **FEMS Microbiology Letters**, v. 252, n. 2, p. 267- 272, 2005.

KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 10, p. 813-829, 2003.

KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v.2, n.2, p.123-140, 2004.

KARMALI, M.A.; GANNON, V.; SARGEANT, J.M. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3, p. 360-370, 2009.

KHALIL, N. Incidence of *Aeromonas hydrophila* group in raw milk and some dairy products in Assiut city. **Assiut Veterinarian Medicine Journal**, v. 37, n. 1, p. 100- 107, 1997.

KIROV, S. M. The public health significance of *Aeromonas spp.* in foods. **International Journal Food Microbiology**, v. 20, n. 4, p. 179-198, 1993.

KOTZEKIDOU, P.; GIANNAKIDIS, P.; BOULAMATIS, A. Antimicrobial activity of some plant extracts and essential oils against foodborne pathogens in vitro and the fate of inoculated pathogens in chocolate. **LTW – Food Science and Tecnology**, v. 41, n. 1, p. 119-127, 2007.

KROVACEK, K.; DUMONTET, S.; ERIKSSON, E.; BALODA, S. B. Isolation, and virulence profiles of *Aeromonas hydrophila* implicated in an outbreak of food poisoning in Sweden. **Microbiology and Immunology**, v. 39, n. 9, p. 655-661, 1995.

LAMBERT, R.J.W., SKANDAMIS, P.N., COOTE, P., NYCHAS, G.-J.E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 3, p.453–462, 2001.

LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetics and Molecular Research**, v. 2, n. 1, p. 63-76, 2003.

LEISTNER, L. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 55, n. 1-3, p. 181-186, 2000.

LEMAY, W.J.; CHOQUETTE, J.; DELAQUIS, P.J.; GARIÉPY, C.; RODRIGUE, N.; SAUCIER, L. Antimicrobial effect of natural preservatives in a cooled and acidified chicken meat model. **International Journal of Food Microbiology**, v.78, n.3, p.217-226, 2002.

LEMES-MARQUES, E.G.; CRUZ, C.D.; DESTRO, M.T. Pheno- and genotypic characterization of *Listeria monocytogenes* clinical isolates from the southwestern region of the State of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, n. 2, p.287-292, 2007.

LEVINE, M.M.; XU, J.; KAPPER, J.B.; LIOR, H.; PRADO, V.; TALL, B.; NATARO, J.; KARCH, H.; WACHSMUTH, K. A DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. **Journal of Infection and Disease**, v. 156, n. 1, p. 175-182, 1987.

- LIANO, A.; SOFOS, J.N. A review of the incidence and transmission of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products in retail and food service environments. **Journal of Food Protection**, v.70, n.9, p.2172-2198, 2007.
- LOWY, F. D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Investigation**, v.111, n. 9, p. 1265-1273, 2003.
- LUCENA, R. F. **Isolamento e Caracterização de *Aeromonas* em carcaças suínas**. Dissertação. 2007, 116 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, 2007.
- LUES, B.; VAN TONDER, M. D. The occurrence of indicator bacteria on hands and aprons of food handlers in the delicatessen sections of a retail group. **Food Control**, v.18, n. 4, p. 326-332, 2007.
- MACEDO, M.; FERREIRA, A. R. Plantas medicinais usadas para tratamento dermatológicos, em comunidades da Bacia do Alto Paraguai, Mato Grosso. **Revista Brasileira de Farmacognosia** v.14, n.1, p. 40-44, 2004.
- MAIA, G.N. *Caatinga árvores e arbustos e suas utilidades*. 1 ed. São Paulo: Leitura & Arte, 2004.
- MARTÍN, M. C.; FUEYO, J. M.; GONZÁLEZ-HEVIA, M. .; MENDOZA, C. M. Genetic procedures for identification of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* from three food poisoning outbreaks. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 279-286, 2004.
- MARCHAND, S.; COUDIJSER, K.; DEWETTINCK, M.H.K.; BLOCK, J.D. Selective determination of the heat-resistant proteolytic activity of bacterial origin in raw milk. **International Dairy Journal**, v.18, n. 5, p.514-519, 2007.
- MARTINS, E. A.; GERMANO, P. M. L. *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat, sliced, cooked ham and salami products, marketed in the city of São Paulo, Brazil: Occurrence, quantification, and serotyping. **Food Control**, v. 22, n. 2, p. 290-302, 2011.
- MATOS, F.J.A. **Plantas da medicina popular do Nordeste: propriedades atribuídas e confirmadas**. Fortaleza: EDUFCE, 1999.
- MECHKOVSKI, A.; AKERELE, C. O. **Quality control methods for medicinal plant materials**. Switzerland: World Health Organization, (1992).
- MENDONÇA, A.T. **Efeito dos óleos essenciais de condimentos sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* em ricota**. 2004. 72f. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.
- MENDONÇA, D. E.; ONOFRE, SIDENEY, B. Atividade antimicrobiana do óleo-resina produzido pela copaiba – *Copaifera multijuga* Hayne (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2, p. 577-581. 2009.

MENON, K. V.; GARG, S. R. Inhibitory effect of clove oil on *Listeria monocytogenes* in meat and cheese. **Food Microbiology**, v. 18, n. 6, p. 647 - 650, 2001.

MORAIS, S. M. L., CAVALCANTI, E. S. B., BERTINI, L. M. OLIVEIRA, C. L. L.; RODRIGUES, J. R. B. & CARDOSO, J. H. L. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian *Croton* species against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Assoc.** v. 22, n. 1, p. 161-164, 2006.

MÜRMAN, L.; DOS SANTOS, M. C.; CARDOSO, M. Prevalence, genetic characterization and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from fresh pork sausages in Porto Alegre, Brazil. **Food Control**, v. 20, n. 3, p. 191-195, 2009.

NAIR, M. K. N.; VASUDEVAN, P.; VENKITANARAYANAN, K. Antibacterial effect of black seed oil on *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v.16, n.5, p. 395-398, 2005.

NAKANISHI, N.; TASHIRO, K.; KUHARA, S.; HAYASHI, T.; SUGIMOTO, N.; TOBE, T. Regulation of virulence by butyrate sensing in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. **Microbiology**, v.155, n.2, p.521-530, 2009.

NASCIMENTO, A. R. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais frente a bactérias isoladas de sururu (*Mytella falcata*)**. 2004, 91f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

NOGUEIRA, M.C.L.; LUBACHEVSKY, G.; RANKIN, S.A. A study of the volatile composition of Minas cheese. **LWT-Food Science and Technology**, v. 38, n. 5, p.555-563, 2005.

NOSTRO, A.; BLANCO, A. R.; CANNATELLI, M. A.; ENEA, V.; FLAMINI, G.; MORELLI, I.; ROCCARO, A. S; ALONZO, V. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. **FEMS Microbiology Letters**, v. 230, n. 2, p. 191-195, 2004.

OLIVEIRA, D. R.; LEITÃO, G. G.; SANTOS, S. S.; BIZZO, H. R.; LOPES, D.; ALVIANO, C. S.; ALVIANO, D. S. LEITÃO, S. G. Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximina, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, n. 1, p. 103-108, 2006.

ONOFRE, S.B.; FABIANE, K.C.; FERRONATTO, R.; SANTOS, A.C., Physicochemical characteristics of the essential oils of *Baccharis dracunculifolia* and *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 197-203, 2008.

OUATTARA, B.; SABATO, S. F.; LACROIX, M. Combined effect of antimicrobial coating and gamma irradiation on shelf life extension of pre cooked shrimp (*Penaeus* spp.). **International Journal of Food Microbiology**, v. 68, n. 1/2, p. 1- 9, 2001.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* 0157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 414-420, 2007.

PAL, A.; LABUZA, T.P.; DIEZ-GONZALEZ, F. Comparison of primary predictive models to study the growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures in liquid cultures and

selection of fastest growing ribotypes in meat and turkey product slurries. **Food Microbiology**, v. 25, n. 2, p. 460–470, 2008.

PALMEIRA JÚNIOR, S. F. **Contribuição ao conhecimento uimiotaxonômico da família Euphorbiaceae. Estudo químico de duas espécies do gênero Croton (C. sellowii Baill. e C. brasiliensis Muell. Arg.).** 2005. 317f. Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia) Universidade Federal de Alagoas, Maceio, 2005.

PALU, A. P.; GOMES, L. M.; MIGUEL, M. A. L.; BALASSIANO, I. T.; QUEIROZ, M. L.; FREITAS- ALMEIDA, A. C.; OLIVEIRA, S. S. Antimicrobial resistance in food and clinical *Aeromonas* isolate. **Food Microbiology**, v. 23, n.4, p. 504-509, 2006.

PANNEERSEELA, N. L.; MURIANA, P. M. An immunomagnetic PCR signal amplification assay for sensitive detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins in foods. **Journal Food Protection**, v. 72, n. 12, p. 2538–2546, 2009.

PAUL, S.; DUBEY, R. C.; MAHESWARI, D. K.; KANG, S. C. *Trachyspermum ammi* (L.) fruit essential oil influencing on membrane permeability and surface characteristics in inhibiting food-borne pathogens. **Food Control**, v. 22, n. 4, p. 724-731, 2011.

PELISSER, M.R.; MENDES, S.D.C.; SUTHERLAND, A.D.; BATISTA, C.R.V. Detection of *Listeria* species in refrigerated chicken carcasses using Clearview™ and a modified conventional culture method. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, n. 2, p.113-116, 2001.

PENNEY, V.; HENDERSON, G.; BLUM, C.; JOHNSON-GREEN, P. The potential of phytopreservatives and nisin to control microbial spoilage of minimally processed fruit yogurts. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 5, n. 3, p. 369-375, 2004.

PERAZZO, F. F., CARVALHO, J. C. T., RODRIGUES. M., MORAIS, E. K. L., MACIEL, M. A. M. Comparative anti-inflammatory and antinociceptive effects of terpenoids and an aqueous extract obtained from *Croton cajucara* Benth. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.2, p. 521-528, 2007.

PEREIRA, C. S.; POSSAS, C. A.; VIANA, C. M.; RODRIGUES, D.P. *Aeromonas* spp. E *Plesiomonas shigelloides* isoladas a partir de mexilhões (*perna perna*) in natura e pre-cozidos no RJ. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 562-566, 2004.

PEREZ-AMADOR M. C.; MONROY, M. A.; BUSTAMANTE, G. Essential oil in leaves of *Croton pseudoniveus* & *C suberosus* (Euphorbiaceae) species. **Phyton**, v 53, n. 2, p. 109-112, 2007.

PICHERSKY, E.; NOEL, J. P.; DUDAREVA, N. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. **Science**. v. 311, n. 5764, p. 808–811, 2006.

PLYM-FORSHELL, L.; WIERUP, M. *Salmonella* contamination: a significant challenge to the global marketing of animal food products. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v.25, n.2, p.541-554, 2006.

POSFAY-BARBE, K.M.; WALD, E.R. Listeriosis. **Seminars in Fetal & Neonatal Medicine**, v.14, n.4, p.228-233, 2009.

PRABUSEENIVASAN, S.; M, JAYAKUMAR.; S, IGNACIMUTHU. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 39, n. 6, 2006.

PRADHAN, A. K.; IVANEK, R.; GROHN, Y. T.; BUKOWSKI, R.; GEORNARAS, I.; SOFOS, J. N.; WIEDMANN, M. Quantitative risk assessment of listeriosis-associated deaths due to *Listeria monocytogenes* contamination of deli meats originating from manufacture and retail. **Journal of Food Protection**, v.73, n. 4, p. 620-630, 2010.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

RAMASWAMY, V.; CRESENCE, V.M.; REJITHA, J.S.; LEKSHMI, M.U.; DHARSANA, K.S.; PRASAD, S.P.; VIJILA, H.M. *Listeria*: review of epidemiology and pathogenesis. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v.40, n.1, p.4-13, 2007.

RANDAU, K.P. **Estudo farmacognóstico (farmacobotânico e farmacológico) e atividade biológica do *Croton rhamnifolius* H.B.K. e *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm. (Euphorbiaceae)**. 2001. 143p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2001.

RANDAU, K. P, FLORÊNCIO, D. C., FERREIRA, C.P., XAVIER, H. S. Estudo farmacognóstico de *Croton rhamnifolius* H.B.K. e *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 2, p. 89-96, 2004.

RESCHKE, A.; MARQUES, L. M.; MAYWORM, M. A. S. Atividade antibacteriana de *Ficus benjamina* L. (*Moraceae*). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 2, p. 67-70, 2007.

RHOADES, J.R.; DUFFY, G.; KOUTSOUMANIS, K. Prevalence and concentration of verocytotoxigenic *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in the beef production chain: a review. **Food Microbiology**, v.26, n.4, p.357-376, 2009.

RIVOAL, K.; QUÉGUINER, E.; BOSCHER, E.; BOUGEARD, S.; ERMEL, G.; SALVAT, G.; FEDERIGHI, M.; JUGIAU, F.; PROTAIS, J. Detection of *Listeria monocytogenes* in raw and pasteurized liquid whole eggs and characterization by PFGE. **International Journal of Food Microbiology**, v. 138, n. 1-2, p. 56-62, 2010.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e farmacobiocologia**. São Paulo: Premie 1997.

ROCHA, F. F.; NEVES, E. M. N.; COSTA, E. A.; MATOS, L. G.; MÜLLER, A. H.; GUILHON, G. M. S. P.; CORTES, W.S.; VANDERLINDE, F. A. Evaluation of antinociceptive and antiinflammatory effects of *Croton pullei* var. *glabrior* Lanj. (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia** v.18, n.3, p. 344-349, 2008.

RODRIGUES, M.R.A. **Estudo dos óleos essenciais presentes em manjerona e orégano.** 2002. 163f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

SACCHETTI, G.; MAIETTI, S.; MUZZOLI, M.; SCAGLIANTI, M.; MANFREDINI, S.; RADICE, M.; BRUNI, R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**, Oxford, v. 91, n. 4, p. 621-632, Aug. 2005.

SALATINO, A., SALATINO, M. L. F., NEGRI, G. Traditional uses, Chemistry and pharmacology of Croton species (Euphorbiaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 1, p. 11-33, 2007.

SALVAT, A; ANTONNACI, L; FORTUNATO, R.H; SUAREZ, E.Y; GODOY, H.M. Screening of some plants from Northern Argentina for their antimicrobial activity. **Letters in Applied Microbiology**, v.32, n.5, p.293-297, 2001.

SANTIESTEBAN-LÓPEZ, A.; PALOU, E.; LÓPEZ-MALO, A. Susceptibility of food-borne bacteria to binary combinations of antimicrobials at selected a_w and pH. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 2, p. 486-497, 2007.

SANTOS, M.R.A.; INNECO, R.; SOARES, A. Caracterização anatômica das estruturas secretoras e produção de óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. Em função do horário de colheita nas estações seca e chuvosa. **Revista Ciência Agronômica**, v.35 n.2, p.377-383, 2004.

SANTOS, S. C.; KRUEGER, C. L.; STEIL, A. A.; KREUGER, M. R.; BIAVATTI, M. W.; WISNIEWKI, J. R. A. LC characterisation of guaco medicinal extracts, *Mikania laevigata* and *M. glomerata*, and their effects on allergic pneumonitis. **Planta Medica**, v. 72, n. 8, p. 679 - 684, 2006.

SARRIA, J. C.; VIDAL, A. M.; KIMBROUGH, R. C. Salmonella enteritidis brain abscess: case report and review. **Clinical Neurology of Neurosurgery**, v. 102, n. 4, p. 236-239, 2000.

SCALLAN, E., HOEKSTRA, R. M., ANGULO, F. J., TAUXE, R. V., WIDDOWSON, M. - A., ROY, S. ., JONES, J. L.; GRIFFEN, P. M. Foodborne illness acquired in the United States—Major pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n, p. 7–15, 2011.

SERAFINI, L.; PANSERA, M. R.; SANTOS, A. C.; ROSSATO, M.; PAULETTI, G. F.; ROTA, L. D. Variation in essential oil yield and composition of *Lippia alba* (Mill.) N.E.Br. grown in southern Brazil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 4, n. 2, p. 72-74, 2002.

SHELEF, L.A. Antimicrobial effects os spices. **Journal of Food Safety**, v. 6, n. 1, p. 29-44, 1983.

SHELOBOLINA, E.S.; SULLIVAN, S.A.; O'NEILL, K.R.; NEVIN, K.P.; LOVLEY, D.R. Isolation, characterization, and U(VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant Bacterium from Low-pH, nitrate- and U(VI)-contaminated subsurface sediment and

description of *Salmonella subterranea* sp. nov. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.5, p.2959-2965, 2004.

SILA, J.; SAUER, P.; KOLAR, M. Comparison of the prevalence of genes coding for enterotoxins, exfoliatins, panton-valentine leukocidin and tsst-1 between methicillin-resistant and methicillin-susceptible isolates of *Staphylococcus aureus* at the university hospital in olomouc. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub**, v. 153, n. 3, p. 215-218, 2009.

SILVA, I.M.M.; ALMEIDA, R.C.C.; ALVES, M.A.O.; ALMEIDA, P.F. Occurrence of *Listeria* spp. in critical control points and the environment of Minas Frescal cheese processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 81, n. 3, p. 241-248, 2003.

SILVA, W.P.; GANDRA, E.A. Estafilococos coagulase positiva: patógenos de importância em alimentos. **Revista Higiene Alimentar**, v.18, n.122, p. 32-40, 2004.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Ed. UFSC, 2007.

SIMÕES, C. M.; SPITZEER, V. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: UFSC, 2004.

SINGH, A.; SINGH, R. K.; BHUNIA, A. K.; SINGH, N. Efficacy of plant essential oils as antimicrobial agents against *Listeria monocytogenes* in hotdogs. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 36, n. 8, p. 787-794, 2003.

SKANDAMIS, P. N.; NYCHAS, G.-J. E. Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 6, p. 1011-1022, 2001.

SMITH, H.; WILLSHAW, G.; CHEASTY, T. *E. coli* as a cause of outbreaks of diarrhoeal disease in the UK. **Microbiology Today**, v.3, p. 17-18, 2004.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. **Food Microbiology**, v. 18, n. 4, p. 463-470, 2001.

SOLER, L.; CHACON, M. R.; AGUILERA-ARREOLA, M. G.; CATALAN, V. FIGUERAS, M. J. Phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas* based on two housekeeping genes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 6, p.1511-1519, 2004.

SOLOMAKOS, N.; GOVARIS, A.; KOIDIS, P.; BOTSOGLOU, N. The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin and their combination against *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef during refrigerated storage. **Meat Science**, v. 80, n. 2, p. 159-166, 2008.

SORIANO, J. M.; FONT, G.; MOLTÓ, C.; MAÑES, J. Enterotoxigenic staphylococci and their toxins in restaurant foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 13, n. 2, p. 60-67, 2002.

SOUZA, E.L.; STAMFORD, T.L.M.; LIMA, E.O. Sensitivity of spoilage and pathogen food-related bacteria to *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) essential oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 527-532, 2006.

SOUZA, E.L.; STAMFORD, T.L.M.; LIMA, E.O.; TRAJANO, V.N. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. **Food Control**, 18, 409-413, 2007.

SOUZA, E. L.; BARROS, J. C.; OLIVEIRA, C. E. V.; CONCEIÇÃO, M. C. Influence of *Origanum vulgare* L. essential oil on enterotoxin production, membrane permeability and surface characteristics of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, n. 2-3, p. 308–311, 2010.

SOUZA, E.L.; STAMFORD, T.L.M.; LIMA, E.O.; TRAJANO, V.N.; FILHO, J.M.B. Antimicrobial effectiveness of spices: an approach for use in food conservation systems. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 4, p. 549-558, 2005.

SOUZA, E.L.; STAMFORD, T.L.M.; LIMA, E.O.; TRAJANO, V.N.; FILHO, J.M.B. Óregano (*Origanum vulgare* L., *Lamiaceae*): uma especiaria como potencial fonte de compostos antimicrobianos. **Higiene Alimentar**, v. 19, n. 132, p. 40-45, 2005.

SUÁREZ, A.I., L.J. VÁSQUEZ, M.A. MANZANO & R.S. COMPAGNONE. Essential oil composition of *Croton cuneatus* and *Croton malambo* growing in Venezuela. **Journal Flavour Fragrance**, v 20, n. 3, p. 611-614, 2005.

SWAMINATHAN, B.; GERNER-SMIDT, P. The epidemiology of human listeriosis. **Microbes and Infection**, v.9, n.10, p.1236-1243, 2007.

SWITT, A.I.; SOYER, Y.; WARNICK, L.D.; WIEDMANN, M. Emergence, distribution, and molecular and phenotypic characteristics of *Salmonella* enterica serotype 4,5,12:i. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.6, n.4, p.407-415, 2009.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artemed, 2004.

TAVECHIO, A.T.; GHILARDI, A.C.; PERESI, J.T.; FUZIHARA, T.O.; YONAMINE, E.K.; JAKABI, M.; FERNANDES, S.A. *Salmonella* serotypes isolated from nonhuman sources in São Paulo, Brazil, from 1996 through 2000. **Journal of Food Protection**, v.65, n.6, p.1041-1044, 2002.

TORRES, M. C. M. **Estudo Químico e Biológico de *Croton regelianus* Var. *matosii* (Euphorbiaceae)**. 2008. 8p. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica). Universidade Federal do Ceará.

TORRICO, F., CEPEDA, M., GUERRERO, G., MELENDEZ, F., BLANCO, Z., CANELÓN, D. J., DIAZ, B., COMPAGNONE, R. S, SUÁREZ, A. I. Hypoglycaemic effect of *Croton cuneatus* in streptozotocin-induced diabetic rats. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.17, n. 2, p. 166-169, 2007.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; MARTINEZ, M. B; CAMPOS, L. C.; GOMPERTZ, O. F.; RÁCZ, M. L. 5. Ed. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 2008.

TROVÓ FABIANO, T.L.; LEMOS, M.V.F.; GIVISIEZ, P.E.N. Fluorescent amplified fragment length polymorphism genotyping of human and animal *Staphylococcus aureus* isolates from dairy farms with manual milking. **Veterinary Microbiology**, v. 109, n. 1-2, p. 57-63, 2005.

TURGIS, M. A.; JAEJOON, H. B.; STÉPHANE, C. A.; LACROIX, M. Antimicrobial activity of mustard essential oil against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhi*. **Food Control**. v. 20, n. 12, p. 1073-1079, 2009.

UEHARA, F. **Concordancia entre perfil de restricao do fragmento 16S rDNA e testes fenotipicos para determinacao do posicionamento taxonomico de cepas de *Aeromonas***. 2008. 98 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

ULTEE, A., BENNINK, M.H.J., MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n.4, p.1561–1568, 2002.

ULTEE, A.; KETS, E. P. W.; ALBERDA, M.; HOEKSTRA, F. A.; SMID, E. J. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. **Archives of Microbiology**, v. 174, n. 4, p. 233-238, 2000.

VALMORBIDA, J.; BOARO, C.F.S.; MARQUES, M.O.M.; FERRI, A.F. Rendimento e composição química de óleos essenciais de *Mentha piperita* L. cultivada em solução nutritiva com diferentes concentrações de potássio. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v, 8, n.4 , p. 56-61, 2006.

VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D.F. *Compendium for the Microbiological Examination of Foods*. 3. ed. Washington: Public Health Association, 1992.

VASCONCELOS, N.G.; CUNHA, M.L.R.S. Staphylococcal enterotoxins: Molecular aspects and detection methods. **Journal of Public Health and Epidemiology**, v.2, n.3, p.29-42, 2010.

VASILEV, V.; JAPHETH, R.; ANDORN, N.; YSHAI, R.; AGMON, V.; GAZIT, E.; KASHI, Y.; COHEN, D. A survey of laboratory-confirmed isolates of invasive listeriosis in Israel, 1997-2007. **Epidemiology and Infection**, v.137, n.4, p.577-580, 2009.

VAZQUEZ-BOLAND, J.A.; DOMINGUEZ-BERNAL, G.; GONZALEZ-ZORN, B.; KREFT, J.; GOEBEL, W. Pathogenicity islands and virulence evolution in *Listeria*. **Microbes and Infection**, v.3, n.7, p.571-584, 2001.

VOJTOV, N.; ROSS, H. F.; NOVICK, R. P. Global repression of exotoxin synthesis by staphylococcal superantigens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 15, p. 10102-10107, 2002.

WAN, J.; WILCOCK, A. COVENTRY, M. J. The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, n. 2, p. 152-158, 1998.

WIJNKER, J. J.; KOOP, G.; LIPMAN, L. J. A. Antimicrobial properties of salt (NaCl) used for the preservation of natural casings. **Food Microbiology**, v. 23, n. 7, p. 657-662, 2006.

YU-SHIH, C., FRANK, L. L., PING-ING, L., CHUN-YI, L., CHIEN-YI, C., HUNG-CHIEH, C. Neonatal Listeriosis. **Journal of Formosan Association**, v. 102, n. 2, p. 161-164, 2007.

ZHANG W., BERBEROV E., FREELING J., HE D., MOXLEY R.; FRANCIS D.H. Significance of heat stable and heat-labile enterotoxins in porcine colibacillosis in an additive model for pathogenicity study. **Infection Immunology**, v. 76, n. 6, p.3107-3114, 2006.

ZHAO, S., WHITE, D. G., FRIEDMAN, S. L., GLENN, A., BLICKENSTAFF, K., AYERS, S. L. Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovar Heidelberg isolates from retail meats, including poultry, from 2002 to 2006. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 21, p. 6656–6662, 2008.