

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

**GEISEANNY FERNANDES DO AMARANTE MELO**

**ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E DA ATIVIDADE**  
**ANTIBACTERIANA *IN VITRO* E EM ALIMENTO DO ÓLEO**  
**ESSENCIAL DE *Croton blanchetianus* Baill**

**JOÃO PESSOA - PB**  
**2011**

**GEISEANNY FERNANDES DO AMARANTE MELO**

**ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E DA ATIVIDADE  
ANTIBACTERIANA *IN VITRO* E EM ALIMENTO DO ÓLEO  
ESSENCIAL DE *Croton blanchetianus* Baill**

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

**Orientador: Profº. Dr. Vicente Queiroga Neto**

**JOÃO PESSOA  
2011**

M528e Melo, Geiseanny Fernandes do Amarante.

Estudo da composição química e da atividade antibacteriana in vitro e em alimento do óleo essencial de *Cróton blanchetianus* Baill / Geiseanny Fernandes do Amarante Melo.- João Pessoa, 2011.

94f. : il.

Orientador: Vicente Queiroga Neto

Dissertação (Mestrado) – UFPB/CT

1. Tecnologia de Alimentos. 2. *Croton blanchetianus* Baill (marmeleiro). 3. Óleo essencial. 4. Antimicrobiano.

UFPB/BC

CDU: 664(043)

**GEISEANNY FERNANDES DO AMARANTE MELO**

**ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E DA ATIVIDADE  
ANTIBACTERIANA *IN VITRO* E EM ALIMENTO DO ÓLEO  
ESSENCIAL DE *Croton blanchetianus* Baill**

Dissertação aprovada em 14 / 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.

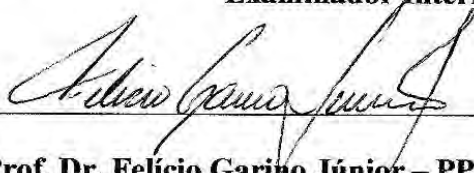
**BANCA EXAMINADORA**



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



**Prof.ª PhD. Marta Suely Madruga – PPGCTA/CT/UFPB  
Examinador Interno**



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

*Dedico*

*A Deus, por ser o Senhor da minha vida*

*Aos meus pais, Washington Bernardo Medeiros de Melo e Maria da Glória Fernandes do Amarante, e irmã, Glorianny Fernandes do Amarante Melo, pelo amor e apoio familiar em prol dos meus estudos.*

*E meu amado, Hermesson Teixeira Peixoto, por todo o carinho, incentivo e companheirismo.*

## AGRADECIMENTOS

Referenciar a todos que colaboraram no desenvolvimento deste trabalho é uma tarefa difícil. As contribuições foram muitas: orações, pensamentos positivos, sugestões, críticas, atos e até omissões, mas agradeço a todos sem distinções. Foi um momento de crescimento!

A Deus, a quem entrego constantemente minha vida, pela proteção e saúde, por iluminar meus caminhos e me carregar em seus braços quando me falta forças;

Aos meus pais, Washington Bernardo Medeiros de Melo e Maria da Glória Fernandes do Amarante, e irmã, Glorianny Fernandes do Amarante Melo, pelo amor incondicional, conhecimentos repassados e todo o apoio familiar em prol dos meus estudos;

Ao meu amado, Hermesson Teixeira Peixoto, pelo amor, carinho, incentivo e apoio, compreendendo minhas angústias, estresses e limitações, e me confortando nos momentos mais difíceis. E a toda a sua família que me acolheu com muito amor;

A todos da minha família e meus queridos amigos que me apoiaram nessa minha jornada;

Ao meu orientador professor Dr. Vicente Queiroga Neto, pela confiança depositada durante o período deste curso e pela orientação na execução deste trabalho;

À professora Dr<sup>a</sup>. Maria Lúcia da Conceição, por ter sido a primeira a acreditar no meu trabalho e no meu potencial, por ter me aceitado no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, onde tudo começou. Obrigada pela confiança, orientação na monitoria, conhecimentos repassados, pela amizade, incentivo e dedicação que me ajudaram a chegar até aqui;

À professora Dr<sup>a</sup>. Marta Suely Madruga, como coordenadora da Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela dedicação, responsabilidade e empenho em todas as etapas deste curso, pelas valiosas contribuições, disponibilidade e pelo exemplo de profissional;

Ao professor Dr. Felício Garino Júnior, pelo auxílio na disponibilização das instalações laboratoriais, pelas preciosas contribuições, atenção, dedicação e convívio no laboratório, proporcionando as condições necessárias à execução dos trabalhos de bancada. Muito obrigada;

Aos professores Ms. Pedro José Santos Carneiro Cruz e Ms. Ana Cláudia Cavalcanti Peixoto de Vasconcelos, como coordenadores do PINAB contribuíram para que eu siga a carreira acadêmica, me incentivando a ser educadora;

À professora Dr<sup>a</sup>. Maria de Fátima Araújo e Jair Moisés de Sousa do Herbário da UFCG pela identificação da espécie, e pelo exemplo de profissionais dedicados e atenciosos;

Aos professores Dr. Onaldo Guedes Rodrigues (UFCG/Patos) e Dr. José Galberto Martins (LPPN/URCA) pela presteza e colaboração na análise da composição do óleo essencial;

Aos funcionários dos laboratórios Gilvandro UFPB/CT, Claudionor UFPB/CT, Nonato UFPB/LTF, Tatiana UFPB/Bananeiras e Alexandre UFCG/Patos, pelo apoio e auxílio nas análises físico-químicas;

Aos professores da Pós-Graduação que pelos ensinamentos, colaboraram para a concretização de mais uma etapa da minha vida;

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

Aos colegas de turma da Pós-Graduação, pela amizade, espírito cooperativo, incentivo e bons momentos de agradável convívio e troca de experiências;

Aos colegas do Curso de Nutrição pelo carinho e a convivência e principalmente a troca de conhecimento que contribuíram para o meu crescimento profissional. Em especial as amigas: Camila, Kattaryna, Lanny, Josy, Júlia, Amanda, Jossana, Maria Eugênia, Kelly, Renata, Janne, Sheilla, Nara Raquel, Anna Júlia, pela amizade, apoio, incentivo e por todas as palavras carinhosas que recebi de vocês, muito obrigada.

À Nelson Justino Neto, pela amizade e por tudo o que representa em minha vida, pela torcida de sempre e presença constante em todos os momentos importantes. Sou grata por tudo que fizeste por mim. Quando tudo parecia perdido, Deus colocou anjos em minha vida;

À Ana Caroliny, pelos momentos de descontração, companheirismo, dedicação e bastante ajuda durante os experimentos, que iniciou comigo no laboratório, e tem participado desde então de todas as etapas acadêmicas de grande importância em minha vida;

À Lauricélia e sua família, que nos acolheram em sua casa com muito amor e carinho;

Ao colega Eduardo Vasconcelos, pelo apoio, incentivo e auxílio nas planilhas e na análise estatística dos dados;

À Rosália Severo de Medeiros, pela amizade conquistada, e todas as contribuições e apoio durante a realização das análises em Patos;

Aos Arthur, Rodrigo e Ramon pela disponibilidade e agradável convívio no Laboratório de Microbiologia de Patos;

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo;

A todas as pessoas que mencionei e aqueles que mesmo sem estarem descritos aqui contribuíram de alguma forma para essa conquista. Agradeço a todos que torceram e oraram por mim. Sou muito grata a todos vocês. É de coração que eu lhes digo:

Muito Obrigada!

## RESUMO

Considerando a busca por novas substâncias antimicrobianas a partir de fontes naturais, o *Croton blanchetianus* Baill (marmeleiro) surge como uma planta aromática distribuída nas regiões tropical e subtropical e possui algumas atividades biológicas. No presente estudo, o óleo essencial das folhas de *Croton blanchetianus* Baill, foi avaliado com o objetivo de identificar os constituintes químicos e analisar a sua atividade antibacteriana *in vitro* frente a micro-organismos e em modelo alimentar (pedaços de carne). A extração do óleo essencial do Marmeleiro (*Croton blanchetianus* Baill) foi realizada através do processo de hidrodestilação e a análise da composição química por cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas (CG-EM). Para a caracterização físico-química do óleo essencial foram determinados: densidade relativa  $^{20}d_{20}$ , índice de refração  $^{20}n_d$ , solubilidade em álcool, cor e aparência. A avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial do Marmeleiro frente a micro-organismos de interesse em alimentos foi realizada através do método de difusão em placas com zonas de inibição, e a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada através da técnica de macrodiluição em caldo, enquanto que a interferência do óleo essencial na cinética de morte microbiana *in vitro* e em modelo cárneo foi realizada através da contagem de células viáveis. Foram identificados 14 constituintes em uma mistura complexa de monoterpenos (59,43 %) e sesquiterpenos (40,56 %). Os principais componentes encontrados nas folhas foram limoneno (25,70 %),  $\alpha$ -pineno (16,32 %) e biciclogermacreno (13,00 %). A avaliação antibacteriana exibiu atividade contra três estirpes *L. monocytogenes*, *A. hydrophila* e *S. Enteritidis*. Os valores de CIM e CBM do óleo essencial oscilaram de 1,25 - 40  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 2,5 - 80  $\mu\text{g.mL}$ , respectivamente. Os resultados encontrados na cinética de morte mostram um efeito bactericida para *Aeromonas hydrophila* e *Listeria monocytogenes* e bacteriostática para *Salmonella* Enteritidis. Observou-se efeito bacteriostático em todas as concentrações do óleo essencial testadas em carne contaminada com *L. monocytogenes*. Estes resultados mostram a potencialidade do óleo essencial das folhas de *C. Blanchetianus* Baill como fonte alternativa de antimicrobiano natural para uso na conservação de alimentos.

**Palavras-chave:** Óleo essencial. *Croton blanchetianus* Baill. Antimicrobiano. Bactéria.

## ABSTRACT

Considering the search on new antimicrobial substances from natural fonts, the *Croton blanchetianus* Baill (marmeleiro) appears as an aromatic plant distributed on tropical and subtropical regions and it possess some biological activities. In this study, the essential oil from the *Croton blanchetianus* Baill leaves was evaluated with the objective of identifying its chemicals constituents and analyse its antibacterial activity *in vitro* against micro-organisms, and in model food (pieces of meat). The extraction of the essential oil from *Croton blanchetianus* Baill was realized through the process of hydrodistillation and chemical composition analysis by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). To the physical-chemical characterization of the essential oil was determined the relative density, refractive index, solubility in alcohol, color and appearance. The evaluation of antibacterial activity of this essential oil against micro-organisms of interest on food was realized through the plate diffusion method with inhibition zones and determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was shown through the technique of broth macrodilution, while the interference of the essential oil in the *in vitro* microbial death kinetics and its model meat was realized through a count of viable cellular. It was identified 14 constituents in a complex mixture of monoterpenes (59.43%) and sesquiterpenes (40.56%). The main components found on the leaves were limonene (25.70%),  $\alpha$ -pinene (16.32%) and bicyclogermacrene (13.00%). The antibacterial evaluation showed an activity against three strains *L. monocytogenes*, *A. hydrophila* and *S. Enteritidis*. The values of MIC and MBC of the essential oil oscillated from 1.25 to 40  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  and 2.5 to 80  $\mu\text{g.mL}$ , respectively. The results found in the death kinetics showed a bactericidal effect to *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* and bacteriostatic to *Salmonella* Enteritidis. It was observed a bacteriostatic effect in all concentration of the essential oil tested on contaminated meat with *L. monocytogenes*. These results show the potentiality of the essential oil extracted from the leaves of *C. Blanchetianus* Baill as an alternative font of a natural antimicrobial for use in food conservation system.

**Keywords:** Essential oil, *Croton blanchetianus* Baill, antimicrobial, bacteria.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** Efeito do óleo essencial de *Croton blanchetianus* Baill sobre a viabilidade das células de *A. hydrophila*: ( ■ ) controle ( $0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ); ( ● ) CIM/2 ( $10\mu\text{g.mL}^{-1}$ ); ( ▲ ) CIM ( $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ); ( ▼ ) CIM x 2 ( $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) do óleo essencial ..... 67
- Figura 2** Efeito do óleo essencial de *Croton blanchetianus* Baill sobre a viabilidade das células de *Salmonella* Enteritidis: : ( ■ ) controle ( $0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ); ( ● ) CIM/2 ( $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ); ( ▲ ) CIM ( $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ); ( ▼ ) CIM x 2 ( $80 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) do óleo essencial..... 68
- Figura 3** Efeito do óleo essencial de *Croton blanchetianus* Baill sobre a viabilidade das células de *L. monocytogenes*: : ( ■ ) controle ( $0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ); ( ● ) CIM/2 ( $0,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ); ( ▲ ) CIM ( $1,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ); ( ▼ ) CIM x 2 ( $2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) do óleo essencial..... 69
- Figura 4** Efeito do óleo essencial de *Croton blanchetianus* Baill sobre a viabilidade das células de *L. monocytogenes* em pedaços de carne durante armazenamento em refrigeração por 5 dias: ( ■ ) controle ( $0 \mu\text{g.g}^{-1}$ ); ( ● ) CIM ( $1,25 \mu\text{g g}^{-1}$ ); ( ▲ ) CIM x 2 ( $2,5 \mu\text{g.g}^{-1}$ ); ( ▼ ) CIM x 5 ( $6,2 \mu\text{g.g}^{-1}$ ); ( ◆ ) CIM x 10 ( $12,5 \mu\text{g.g}^{-1}$ ) do óleo essencial..... 70

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Composição química do óleo essencial de <i>C. blanchetianus</i> Baill.....	55
<b>Tabela 2</b>	Atividade antimicrobiana do óleo essencial e antibiótico padrão frente a micro-organismos .....	56

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>14</b>
2.1 PLANTAS AROMÁTICAS, MEDICINAIS E CONDIMENTARES .....	14
<b>2.1.1 Metabolismo vegetal secundário</b> .....	<b>16</b>
2.2 ÓLEOS ESSENCIAIS.....	17
<b>2.2.1 Extração e caracterização de óleos essenciais</b> .....	<b>17</b>
<b>2.2.2 Atividade antimicrobiana de óleos essenciais</b> .....	<b>20</b>
2.3 DESCRIÇÃO BOTÂNICA E ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Croton blanchetianus</i> Baill .....	24
2.4 CRESCIMENTO E CONTROLE MICROBIANO EM ALIMENTOS .....	27
2.5 MICRO-ORGANISMOS DE INTERESSE EM ALIMENTOS.....	29
<b>2.5.1 <i>Aeromonas hydrophila</i></b> .....	<b>29</b>
<b>2.5.2 <i>Escherichia coli</i></b> .....	<b>31</b>
<b>2.5.3 <i>Listeria monocytogenes</i></b> .....	<b>32</b>
<b>2.5.4 <i>Pseudomonas fluorescens</i></b> .....	<b>34</b>
<b>2.5.5 <i>Salmonella Enteritidis</i></b> .....	<b>35</b>
<b>2.5.6 <i>Staphylococcus aureus</i></b> .....	<b>37</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>39</b>
3.1 LOCAL DO EXPERIMENTO .....	39
3.2 MATÉRIA-PRIMA PARA OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL .....	39
3.3 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL .....	39
3.4 COMPOSIÇÃO QUÍMICA .....	40
3.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DO <i>Croton blanchetianus</i> Baill .....	41
<b>3.5.1 Determinação da densidade relativa <math>^{20}d_{20}</math></b> .....	<b>41</b>
<b>3.5.2 Determinação do índice de refração <math>^{20}n_d</math></b> .....	<b>41</b>
<b>3.5.3 Solubilidade em etanol (90 %)</b> .....	<b>41</b>
<b>3.5.4 Cor</b> .....	<b>42</b>
<b>3.5.5 Aparência</b> .....	<b>42</b>
3.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA .....	42
<b>3.4.1 Estirpes bacterianas</b> .....	<b>42</b>
<b>3.4.2 Difusão em Placas (screening)</b> .....	<b>43</b>

<b>3.6.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) .....</b>	<b>43</b>
<b>3.6.4 Influência do óleo essencial sobre a cinética microbiana .....</b>	<b>44</b>
<b>3.6.5 Aplicação do óleo essencial em microsistema de conservação de alimento .....</b>	<b>45</b>
<b>3.6.6 Análises estatísticas .....</b>	<b>45</b>
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>46</b>
4.1 ARTIGO 1 - Composição química e atividade antibacteriana <i>in vitro</i> do óleo essencial das folhas de <i>Croton blanchetianus</i> Baill .....	46
4.2 ARTIGO 2 - Sensibilidade de bactérias patogênicas de interesse em alimentos ao óleo essencial de <i>Croton blanchetianus</i> Baill .....	57
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>71</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>72</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Apesar da utilização de diferentes técnicas para garantir a qualidade e a inocuidade de alimentos, a segurança alimentar é uma questão de saúde pública cada vez mais importante. As Doenças Transmitidas por Alimentos – DTAS de origem microbiana, são importantes causas de gastroenterites severas, que podem resultar em hospitalizações, complicações, sequelas a longo prazo e morte (WHO, 2004; GREIG; RAVEL, 2009).

Em razão dos riscos que oferecem pela contaminação com uma variedade de bactérias patogênicas, a carne e seus derivados incluem-se entre os alimentos que mais preocupam os serviços de saúde pública (LISERRE et al., 2002; SAMELIS et al., 2005). Devido a sua riqueza de umidade, proteínas, gorduras e outros nutrientes, alimentos cárneos apresentam alta susceptibilidade às contaminações bacterianas, provocando redução de suas propriedades nutritivas, alterações organolépticas indesejáveis e risco à saúde do consumidor, podendo veicular micro-organismos patogênicos e/ou suas toxinas (DABÉS; SANTOS; PEREIRA, 2001).

Uma das formas de se controlar a multiplicação de micro-organismos indesejáveis nos alimentos é o uso de conservantes químicos. No entanto, a utilização desses agentes não é compatível com a imagem de produtos “naturais”, de grande apelo comercial atualmente. Além disso, alguns conservantes adicionados aos alimentos, visando o aumento da segurança e da vida útil, podem levar à formação de compostos com efeito tóxico e carcinogênico ao organismo humano (PRANOTO et al., 2005; RODGERS, 2001).

Neste cenário, surge uma nova discussão sobre opções inovadoras e emergentes para o alcance da segurança microbiológica dos alimentos, a citar de embalagens ativas, bacteriocinas, culturas protetoras e compostos naturais como extratos, quitosana e óleos essenciais (DEVLIEGHERE et al., 2004; DÍAZ et al., 2002).

Os óleos essenciais são compostos voláteis, naturais, complexos, caracterizados por um odor forte. De acordo com a sua complexa composição, os óleos essenciais demonstram uma imensa variedade de ações farmacológicas, tornando-os potenciais fontes para o desenvolvimento de novas drogas. Essa complexidade química permite que os óleos essenciais possuam uma diversidade de efeitos biológicos, inclusive a ação antimicrobiana (BAKKALI et al., 2008).

De um modo geral, os micro-organismos são capazes de sobreviver em ambientes de diversas condições físicas. Entretanto, existe uma limitação da capacidade de sobrevivência

de determinado micro-organismo, em um meio ambiente desfavorável (CDC, 1997; MOULIN, 2003). Na tentativa de pesquisar novos compostos capazes de debelar o fenômeno da resistência aos antimicrobianos, atualmente em todo mundo, são aproveitados os recursos naturais com bons resultados. Sob este aspecto, a flora se torna o campo para a investigação de soluções inovadoras e satisfatórias na busca de produtos de origem natural, como agentes antimicrobianos através de extratos vegetais, produtos naturais isolados e/ou óleos essenciais (SIMÕES; SPITZER, 2003; SILVA; ALBUQUERQUE, 2005).

Pesquisas publicadas com o óleo essencial de *Croton blanchetianus* Baill, planta amplamente distribuída nas regiões tropical e subtropical, rica em constituintes com variadas atividades biológicas, têm demonstrado um efeito antinociceptivo (CARNEIRO-LOUREIRO, 2003; AMARAL, 2004), além de outras atividades farmacológicas, como antiinflamatória e gastroprotetora (AMARAL, 2004). Um dos constituintes químicos isolados das raízes do *Croton blanchetianus* Baill apresentou atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Saccharomyces cerevisiae* e atividade fungicida contra *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophyts* e *Polyporus sanguineus* (McCHESNEY et al., 1991).

Frente ao reconhecido potencial antimicrobiano dos óleos essenciais e o crescente interesse por parte dos consumidores em alimentos ditos “naturais”, livres de aditivos sintéticos em sua composição, muitos pesquisadores têm se aprofundado na descoberta de antimicrobianos naturais e sua aplicação prática na conservação de alimentos, tomando como base promissores resultados observados em experimentos *in vitro* (PRASSAD; SEENAYYA, 2000; JUGLAL; GOVINDEN; ODHAV, 2002; LEMAY et al., 2002), não apenas na substituição, mas também em uso conjunto, reduzindo os níveis de aditivos sintéticos empregados na elaboração de alimentos.

Diante da relevância em estudos relacionados à obtenção de produtos alimentícios seguros e saudáveis, dando ênfase à utilização de conservantes e aditivos naturais, justifica-se a execução de um estudo dos compostos químicos, bem como da avaliação da influência do óleo essencial de *C. blanchetianus* Baill sobre o efeito antibacteriano de micro-organismos 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. blanchetianus* Baill; (ii) identificação das substâncias voláteis da amostra; (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 matriz cárnea.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 PLANTAS AROMÁTICAS, MEDICINAIS E CONDIMENTARES

Plantas aromáticas são aquelas que podem gerar, por algum processo físico-químico, um produto aromático o qual possui um odor ou sabor determinado, sem avaliar sua qualidade comercial ou estética (BANDONI; CZEPAK, 2008). Planta medicinal, segundo a Organização Panamericana de Saúde (OPS) é qualquer planta usada para aliviar, prevenir ou curar uma doença ou alterar processos fisiológicos e patológicos, ou qualquer planta utilizada como fonte de drogas ou de seus precursores, enquanto que as plantas condimentares são produtos aromáticos de origem vegetal, cujas principais funções incluem conferir sabor, aroma e cor aos alimentos, podendo apresentar propriedade de conservação (ARIAS, 1999; UPNMOOR, 2003; PEREIRA et al., 2006).

O uso de plantas aromáticas como antissépticos e agentes anti-infecciosos, aromatizante e flavorizante em alimentos e bebidas ocorre desde a Antiguidade (CERQUEIRA et al., 2009). Toda a história e, ainda a pré-história do homem discorre em íntima relação com as plantas aromáticas e seus componentes oleosos. Foram encontrados restos de equipamentos semelhantes a destiladores atuais, na cultura mesopotâmica de 5000 anos. Escritos de imperadores chineses, datados de mais de 3000 anos, antes da Era Cristã, listavam centenas de substâncias medicinais, obtidas de plantas. Nesta mesma época, diferentes povos babilônicos já realizavam torças de ervas medicinais (UPNMOOR, 2003; BANDONI; CZEPAK, 2008).

No Brasil, o emprego destas plantas está presente desde antes da colonização, quando os índios já utilizavam ervas, passando pelos colonizadores e tornando-se amplamente utilizadas na medicina caseira em forma de chás, xaropes e outros (MENDONÇA, 2004). Na Região Nordeste, as plantas medicinais e preparações caseiras têm sido utilizadas no tratamento de patologias que afetam a população de baixa renda, tendo em vista a deficiência da assistência médica, a influência da transmissão dos hábitos culturais e a disponibilidade da flora (MATOS; MATOS, 1989).

O uso terapêutico das plantas medicinais tem-se construído na sabedoria do senso comum que articula cultura e saúde, que se encontram inseridos num contexto histórico determinado. Após a Segunda Guerra Mundial, com o uso dos antibióticos e o incremento

cada vez maior de fármacos à base de drogas sintéticas, houve um relativo abandono e, inclusive, certo ceticismo a respeito de produtos naturais (DUARTE et al., 2004). A partir da década de 70 houve uma mudança do ideal de saúde, implicando na conscientização da importância do equilíbrio entre o homem e o ecossistema em que habita, em busca de uma melhoria na qualidade de vida. Dessa forma, valorizou-se a medicina natural como alternativa ao tratamento das doenças (SANTOS, 1995).

No início da década de 1990, a OMS divulgou que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005). Em alguns países de clima tropical como o Brasil, a abundância de plantas medicinais oferece acesso a diversos produtos utilizados, através da automedicação, na prevenção e tratamento de doenças (LORENZI; MATOS, 2002). Portanto, o uso popular das plantas medicinais foi o primeiro passo para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos de baixo custo para uma região tão carente de recursos financeiros e, por outro lado, tão rica em flora, reunindo milhares de espécies vegetais distintas (RABELO, 2003).

Holetz et al. (2002) informam que as plantas são usadas na forma de extratos crus, infusões ou emplastos para o tratamento de infecções comuns, sem qualquer evidência científica de sua eficácia. Contudo, Essawi e Srour (2000) relataram que em vários países as plantas medicinais são empregadas como agentes antibacterianos, antifúngicos e antivirais.

Visto que as plantas constituem uma fonte inesgotável de substâncias potencialmente ativas, devem, portanto, ser consideradas a matéria-prima, como ponto de partida para a descoberta de novas moléculas e para o desenvolvimento de novos fitoterápicos (SIMÕES et al., 2007). Estima-se que existam de 250.000 a 500.000 espécies de vegetais na Terra. Uma porcentagem relativamente pequena (1 a 10%) destas é usada como alimentos por ambas as espécies, humana e animal. Porém, é possível que um número maior do que o acima citado seja utilizado para propostas medicinais (ROWAN, 1999).

Dentre as plantas aromáticas com atividade antimicrobiana destacam-se aquelas da família Lamiaceae, como *Origanum vulgare* (orégano), *Thymus vulgaris* (tomilho), *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Mentha piperita* (menta), *Salvia officinalis* (sálvia), *Ocimum basilicum* (manjeriço) entre outras. Espécies do gênero *Salvia* são extensivamente usadas pela medicina popular, e muitas pesquisas farmacológicas têm pretendido identificar compostos biologicamente ativos responsáveis pelos seus efeitos terapêuticos (MARINO et al., 2001; RADULESCU et al., 2004; BOZIN et al., 2006).

Existem várias plantas aromáticas no Nordeste brasileiro, muitas delas com peculiaridades devido à sua adaptação ao clima semi-árido, algumas das quais são consideradas medicinais pela população local. Estas características têm atraído a atenção de cientistas para o estudo de seus extratos, incluindo os óleos essenciais, sob aspectos químicos, farmacológicos e terapêuticos (LEAL-CARDOSO; FONTELES, 1999; AHMADI, 2010).

A biologia, farmacologia, tecnologia de alimentos e outras áreas têm se interessado em buscar informações úteis para a correta utilização desses compostos, que possuem distribuição e características químicas peculiares. Estudos mostram que determinadas plantas podem variar a concentração de óleo dentro da mesma espécie, influenciadas por fatores hereditários, que dizem respeito às interferências quantitativas e qualitativas, e por fatores ontogênicos, como solo, clima e micro-organismos, entre outros (CARDOSO, 2001).

### **2.1.1 Metabolismo vegetal secundário**

Algumas espécies vegetais sintetizam substâncias de defesa quando são “agredidos” por bactérias, fungos, parasitas, vírus ou outros agentes. Estes compostos são produtos do seu metabolismo secundário, tendo composição química muito variada. Durante muito tempo, os metabólitos secundários foram considerados como produto de excreção vegetal. Atualmente, sabe-se que muitas dessas substâncias estão diretamente envolvidas nos mecanismos que permitem a adequação do produtor ao seu meio, sendo reconhecidas várias funções de substâncias pertencentes a essa classe de metabólitos, como por exemplo, a defesa contra herbívoros e micro-organismos, proteção contra raios UV, atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes (SANTOS, 2004).

Nesse grupo, encontram-se substâncias cuja produção e acumulação estão restritas a um número limitado de organismos, com bioquímica e metabolismos específicos e únicos, caracterizando-se como elementos de diferenciação e especialização (SANTOS, 2004). Todo esse conjunto metabólico é definido como metabolismo secundário, cujos produtos, embora não necessariamente essenciais para o organismo produtor, garantem vantagem para sua sobrevivência e para a perpetuação da sua espécie em seu ecossistema (CASTRO et al., 2004).

Os metabólitos secundários apresentam em sua composição química os terpenos, compostos fenólicos e alcalóides (PERES, 2004). Os terpenos são os principais compostos

dos óleos essenciais, os quais são voláteis e apresentam alta solubilidade em solventes orgânicos como álcool, éter e óleos vegetais e minerais (HERNANDEZ, 2000). Os compostos fenólicos são definidos como substâncias que possuem ao menos, um anel aromático, no qual, geralmente um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila (PEREZ, 2004). Já os alcalóides são compostos com anéis heterocíclicos nitrogenados, fisiologicamente ativos em animais.

A ocorrência de várias atividades biológicas presentes nos metabólitos secundários é de importância comercial tanto na área farmacêutica, quanto nas áreas alimentar, agrônômica e de perfumaria, entre outras. Entre os metabólitos secundários, os principais grupos de compostos encontrados com atividade biológica são os alcalóides, flavonóides, cumarinas, taninos, quinonas e óleos essenciais (FRANCO, 2003). Os óleos essenciais são elementos voláteis contidos em muitos órgãos vegetais e estão relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência vegetal, exercendo papel fundamental na defesa contra micro-organismos (SIQUI et al., 2000).

As propriedades antimicrobianas de substâncias presentes em extratos e óleos essenciais produzidos pelas plantas como uma consequência do metabolismo secundário, também são reconhecidas empiricamente há séculos. Estudos sobre as atividades antimicrobianas de extratos e óleos essenciais de plantas nativas têm sido relatados em muitos países tais como Brasil, Cuba, Índia, México e Jordânia, que possuem uma flora diversificada e uma rica tradição na utilização de plantas medicinais para uso como antibacteriano ou antifúngico (ARRUDA, 2002; DUARTE et al., 2004).

## 2.2 ÓLEOS ESSENCIAIS

### 2.2.1 Extração e caracterização de óleos essenciais

Dentre as moléculas bioativas das plantas encontram-se os metabólitos secundários, tais como óleos essenciais (TEPE et al., 2004) que são definidos pela ISO (International Standard Organization) como produtos obtidos de partes de plantas mediante destilação por arraste com vapor d'água, bem como os produtos obtidos por expressão dos pericarpos de frutos cítricos. De forma geral, são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas,

geralmente odoríferas e líquidas (SANTOS, 2004). Também podem ser chamados de óleos voláteis, óleos etéreos ou essências, por serem de aparência oleosa em temperatura ambiente.

Entretanto, a principal característica do óleo essencial é a volatilidade, diferindo, assim, dos óleos fixos. Outras características importantes são o aroma intenso e agradável e a solubilidade em solventes orgânicos apolares, apresentando ainda solubilidade limitada em água, mas suficiente para aromatizar as soluções aquosas, denominadas hidrolatos. São geralmente incolores ou ligeiramente amarelados em geral, são muito instáveis, principalmente na presença de ar, luz, calor, umidade e metais; a maioria dos óleos voláteis possui índice de refração e são opticamente ativos, propriedades essas usadas na sua identificação e controle da qualidade (SIMÕES et al., 2007; OUSSALAH, 2006).

Dependendo da família, os óleos essenciais podem ocorrer em estruturas secretoras especializadas, tais como pêlos glandulares (Lamiaceae), células parenquimáticas diferenciadas (Lauraceae, Piperaceae, Poaceae), canais oleíferos (Apiaceae) ou em bolsas lisígenas ou esquizolisígenas (Pinaceae, Rutaceae). Os óleos essenciais podem estar estocados em certos órgãos, tais como flores (laranjeira, bergamoteira), folhas (capim-limão, eucalipto, louro) ou ainda nas cascas dos caules (canelas), madeira (sândalo, pau-rosa), raízes, rizomas (cúrcuma, gengibre), frutos (anis-estrelado, funcho, erva-doce) ou sementes (noz-moscada). Embora todos os órgãos de uma planta possam acumular óleos essenciais, sua composição pode variar segundo a localização (ROBBERS et al., 1997; OUSSALAH, 2006).

Seus constituintes variam desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas e cumarinas, até compostos com enxofre. Pode conter cerca de 20–60 componentes em concentrações bem diferentes; caracteristicamente, dois ou três componentes majoritários possuem uma alta concentração (20-70%) enquanto que os outros compostos apresentam-se em menores teores e alguns em baixíssimas quantidades (traços) (BAKKALI et al., 2004).

Os óleos voláteis podem ser obtidos através de diferentes técnicas extrativas a partir de plantas medicinais e aromáticas. De acordo com Serafini et al. (2001), três processos merecem atenção especial no que se refere à obtenção de óleos em níveis laboratoriais: arraste a vapor, hidrodestilação e extração com fluidos supercríticos. Geralmente em indústrias, as essências são extraídas por arraste a vapor, e em escala laboratorial, por hidrodestilação das plantas ou parte das plantas (folhas, flores, sementes e raízes).

O método de extração por arraste a vapor é um dos processos mais usados no Brasil em nível industrial. A destilação por arraste de vapor de água é caracterizada pela sua extrema

simplicidade, onde o material a ser extraído, é geralmente moído ou triturado, e colocado em um recipiente através do qual se faz passar uma corrente de vapor de água, com ou sem pressão. Já o método da hidrodestilação 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. Em escala laboratorial este processo ocorre em aparelho denominado Clevenger (MECHKOVSKI; AKERELE, 1992). A EFS (Extração por Fluido Supercrítico) é uma técnica de interesse analítico, sendo utilizada pela indústria de alimentos, na manufatura de produtos descafeinados (chá, café), desengordurados e desodorizados (óleos vegetais, batatas fritas, salgadinhos e outros), na refinação de óleos vegetais e outros (JALSENJAK et al., 1987). Outros métodos podem ser utilizados para a obtenção de extratos, como por exemplo, extração com Soxhlet, extração com maceração e extração com ultra-som.

Para a avaliação da composição química dos óleos essenciais observa-se que os avanços das técnicas analíticas instrumentais, aliados à simplicidade, rapidez e precisão, tornaram a cromatografia gasosa (CG) uma das técnicas mais difundidas para análises químicas, por apresentar um processo de separação eficiente na elucidação de uma determinada estrutura, quer seja na indústria ou nos laboratórios de pesquisa científica. Vários autores destacam a cromatografia gasosa entre as melhores ferramentas analíticas e de extrema utilidade na análise de misturas complexas (RADULESCU et al., 2004; TEPE et al., 2004; SAHIN et al., 2004; NICKAVAR et al., 2005; AVATO et al., 2005).

A utilização da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) transforma o conjunto das duas técnicas na melhor ferramenta de separação e identificação dos constituintes de uma mistura complexa. Nesta técnica, a amostra é injetada no cromatógrafo a gás e o material eluído é continuamente bombardeado por um feixe de elétrons, obtendo-se assim, o espectro de massas de cada pico cromatográfico, o qual, comparado com uma biblioteca de espectros, permite a identificação do composto (NASCIMENTO FILHO, 2002). Este sistema é amplamente difundido para a caracterização da composição química de óleos essenciais de diversas plantas (BAGAMBOULA et al., 2004; TEPE et al., 2004; BOZIN et al., 2006).

A partir da caracterização química dos óleos essenciais, pesquisas têm apontado algumas propriedades terapêuticas destes, destacando as seguintes: antiviral, antiespasmódica, analgésica, antimicrobiana, cicatrizante, expectorante, relaxante, antisséptica das vias respiratórias, larvicida, vermífuga e anti-inflamatória (HALCON; MILKUS, 2004; COSTA et al., 2005; LIMA et al., 2006; OYEDJI; AFOLAYAN, 2006).

Biologicamente, os óleos essenciais, por serem voláteis, atuam como sinais de comunicação química com o reino vegetal e armas de defesa contra o reino animal. Essa característica torna as plantas que os produzem poderosas fontes de agentes biocidas sendo largamente estudadas na agricultura, por apresentarem atividades bactericidas, inseticidas e fungicidas (SAITO; SCRAMIN, 2000).

O requerimento de dados é imprescindível na aplicação racional de princípios ativos em tratamentos de infecções causadas por fungos, bactérias, parasitas ou vírus (CARMO et al., 1998; ALVES et al., 2000). Tendo em vista que descobertas de constituintes químicos com potentes atividades farmacológicas, embora ainda não inteiramente elucidadas, têm surpreendido a comunidade médico-científica (LIMA et al., 1993; LIMA; FARIAS, 1999).

Fatores externos como, a origem geográfica, temperatura, a umidade relativa, a duração total de exposição ao sol e o regime de ventos, exercem uma influência direta, sobretudo nas espécies que possuem estruturas histológicas de estocagem de óleo essencial na superfície (SALGADO, 2005). Podendo ser responsáveis pela alteração de propriedades do óleo essencial e em sua eficiência, provocando, portanto, variações na composição e características morfológicas (GOUINGUENÉ; TURLINGS, 2002).

Diferenças no rendimento e na composição química de óleos essenciais, sobre a influência da época e horário de colheita, têm sido relatadas em muitas espécies. Estudos em algumas espécies de plantas demonstraram que o rendimento do óleo essencial foi maior no mês de maio e menor em fevereiro e quanto ao horário de colheita, às 18 horas nos meses de maio, agosto e fevereiro e às 12 horas no mês de novembro. Os mesmos autores ainda verificaram uma variação na composição química do óleo essencial ao longo do ano (BLANK et al.; 2005).

### **2.2.2 Atividade antimicrobiana de óleos essenciais**

A atividade antimicrobiana intrínseca de um óleo essencial pode estar diretamente relacionada com a configuração química individual de seus componentes, a proporção em que se apresentam e a interação entre eles (BURT, 2004). Os óleos essenciais podem ter vários componentes antimicrobianos individuais, mas os componentes fenólicos são os responsáveis primários pela ação antimicrobiana e antioxidante, podendo atuar inclusive com efeito sinérgico (KRUGER, 2006).

Dentre os compostos com ação antimicrobiana estão: terpenóides (monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos e saponinas), compostos fenólicos (fenóis simples, taninos, dibenzofuranos e flavonóides), compostos nitrogenados (alcaloides, polipeptídeos cíclicos, glicosídeos), cumarina e cânfora (RESCHKE; MARQUES; MAYWORM, 2007; SIMÕES et al., 2007).

Diante do interesse e o crescimento da demanda de consumo por produtos naturais efetivos e seguros, a pesquisa com extratos, frações e óleos essenciais se faz necessária (LISBALCHIN; DEANS, 1997; OLIVEIRA et al., 2006b). Porém, seu uso como antimicrobiano necessita de critérios rigorosos, por conta dos efeitos colaterais produzidos pela grande maioria desses compostos (CLEELAND; SQUIRES, 1991).

Para tanto, tem-se desenvolvido métodos de investigação *in vitro* que produzam resultados confiáveis e possam ser reproduzidos e validados. Contudo, essa tarefa tem sido dificultada pelas peculiaridades que os óleos apresentam, quais sejam: volatilidade, insolubilidade em água e complexidade, características que interferem significativamente nos resultados. Por isso, em testes de susceptibilidade microbiana, deve-se levar em consideração a técnica usada, o meio de cultura, o(s) micro-organismo(s) e o óleo essencial testado. (NASCIMENTO et al., 2007).

Nos ensaios sobre a atividade antimicrobiana *in vitro* dos óleos essenciais é possível verificar uma variedade de metodologias propostas, o que torna a comparação entre esses estudos problemática (HAMMER et al., 1999). Os métodos comumente usados são os de difusão em disco, difusão utilizando cavidades feitas no ágar, diluição em ágar e diluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima - CIM (TAKAISI-KIKUNI et al., 2000; CANILLAC; MOUREY, 2001; CIMANGA et al., 2002; SHAFI et al., 2002; NOSTRO et al., 2004). Os resultados obtidos por cada um desses métodos podem diferir devido a fatores como as variações entre os testes, a exemplo do crescimento microbiano, exposição de micro-organismos ao óleo, a solubilidade do óleo ou de seus componentes e o uso e quantidade de emulsificador (HAMMER et al., 1999; HOOD et al., 2003; OPALCHENOVA; OBRESHKOVA, 2003).

O método de difusão em placas é reconhecido e satisfatório para determinar a sensibilidade de muitos micro-organismos a determinados fármacos e suficientes quando o mecanismo de resistência decorre da degradação enzimática do agente antimicrobiano pelo organismo, embora forneça resultados semi-quantitativos, e de acordo com alguns autores, qualitativos e nem sempre reprodutíveis (KALEMBA; KUNICKA, 2003; KATZUNG, 2003). Assim sendo, este método deve ser utilizado com cautela, previamente a outros mais precisos.

Apesar das suas limitações, é a técnica mais empregada para a avaliação de atividade antibacteriana e antifúngica de óleos essenciais, dado que é de fácil execução e requer pequenas quantias da amostra (JANSSEN et al., 1987; KALEMBA; KUNICKA, 2003).

A concentração inibitória mínima (CIM) é definida como a menor concentração de óleo essencial em caldo que resulta na ausência de crescimento de micro-organismos visíveis (TORTORA et al., 2000). Pode ser determinada através de métodos de contagem direta, tais como, microscopia e câmaras eletrônicas ou por métodos de contagem indireta como plaqueamento e contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) e também em princípios baseados na turbidez óptica, através das medidas de absorbância em meio líquido adequado ao crescimento do micro-organismo selecionado, juntamente com o agente antimicrobiano em concentrações diferentes. Pesquisadores que utilizam o método de diluição estão normalmente interessados na determinação da CIM e somente em alguns casos utilizam concentração letal mínima (CLM) (PELCZAR et al., 1996; KALEMBA; KUNICKA, 2003).

Os testes de avaliação antimicrobiana são padronizados pela CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) e desenvolvidos para analisar agentes antimicrobianos convencionais como os antibióticos (NOSTRO et al., 2004; DUARTE et al., 2005). Devido às modificações necessárias na metodologia, a descrição precisa das condições em que foi obtido. Deve-se mencionar o número da linhagem do micro-organismo testado, o tempo de exposição do micro-organismo ao óleo, a utilização de controles positivos e negativos, o uso e a quantidade de emulsificador e a composição do óleo (NASCIMENTO et al., 2007).

As diversas investigações científicas para a confirmação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais têm sido baseadas há muito tempo em óleos e extratos de plantas (CLAFFEY, 2003; REHDER et al., 2004; ARRUDA et al., 2006; NUNES et al., 2006). Ainda, tem sido estabelecido cientificamente que cerca de 60% dos óleos essenciais possuem propriedades antifúngicas e 35% exibem propriedades antibacterianas (BHAVANANI; BALLOU, 2000). A suscetibilidade dos micro-organismos a determinado óleo essencial depende das propriedades deste óleo, como sua composição química e suas concentrações, bem como dos micro-organismos utilizados (KALEMBA; KUNICKA, 2003).

Devido aos inúmeros micro-organismos que se tornam resistentes aos múltiplos antimicrobianos disponíveis, o desafio para o tratamento de doenças e infecções torna-se premente, juntamente à necessidade de encontrar novas substâncias com propriedades antimicrobianas a serem utilizadas no combate a esses micro-organismos (DEVIIENNE; RADDI 2002; PEREIRA et al., 2004).

Pesquisas da atividade antimicrobiana, modo de ação e uso potencial de óleos essenciais têm ganhado importância. Atualmente, a avaliação de propriedades antimicrobianas de óleos essenciais abrange uma grande variedade de micro-organismos contra os quais têm sido testados, incluindo micro-organismos deteriorantes de alimentos (RAHMAN; KAN, 2009; TYAGI; MALIK, 2011), micro-organismos produtores de toxinas alimentares (LISBALCHIN; DEANS, 1997; TURGIS; CAILLET; LACROIX, 2009; SAEI-DEHKORDI et al., 2010), fungos patogênicos (AHMADI, 2010; PRIPDEEVECH; CHUKEATIROTE, 2010), e vírus de plantas e animais (SINICO et al., 2005).

Segundo Altman (1989) e 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, pode apresentar atividade antimicrobiana sobre as bactérias mais resistentes. Além disso, o sinergismo entre os compostos do óleo deve ser considerado (KUSTRAK; PEPELJNIAK, 1989; SAVELEV et al., 2003; DELAMARE et al., 2007).

Embora o mecanismo de ação dos óleos essenciais não seja totalmente conhecido, sua atividade biológica é avaliada de diferentes formas. Considerando o grande número de diferentes compostos químicos presentes nos óleos essenciais, provavelmente sua atividade não é atribuída apenas a um mecanismo específico, mas por diversas influências na membrana de micro-organismos. Por sua característica hidrofóbica, estes compostos atuam nos lipídios da membrana das células, modificando sua estrutura e tornando-a mais permeável, podendo ocorrer a passagem de íons e/ou outras substâncias (BURT, 2004).

Dois mecanismos foram propostos até o momento para explicar a ação dos componentes fenólicos na membrana celular: essas moléculas de hidrocarbonetos cíclicos podem se acumular na bicamada lipídica da membrana e distorcer a interação lipídeo proteína, ou ainda, pode haver uma interação direta com compostos lipofílicos com partes hidrofóbicas das proteínas de membrana (BURT, 2004).

Hammer et al. (1999), avaliaram óleos essenciais de salvia (*Salvia officinalis*) e obtiveram valores de CIM de 20 mg mL<sup>-1</sup> para *Enterococcus faecalis*, 5 mg mL<sup>-1</sup> para *Escherichia coli* e 20 mg mL<sup>-1</sup> para *Klebsiella pneumoniae*. Velickovic et al. (2002), obtiveram valores de CIM de 0,5 mg mL<sup>-1</sup> para *Escherichia coli*, 0,4 mg mL<sup>-1</sup> para *Salmonella typhimurium* e 0,2 mg mL<sup>-1</sup> para *Staphylococcus aureus*, quando avaliaram óleos essenciais de tomilho (*Thymus vulgaris*) e menta (*Mentha piperita*). Sahin et al. (2004), avaliaram a atividade biológica do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*) e obtiveram substancial atividade antimicrobiana contra 10 espécies bacterianas testadas. Os valores da

CIM variaram de 0,015 mg mL<sup>-1</sup> a 0,13 mg mL<sup>-1</sup>, dentre as quais destacam-se: *Escherichia coli* 0,031 mg mL<sup>-1</sup>; *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris* e *Staphylococcus aureus* 0,062 mg mL<sup>-1</sup>.

A eficácia dos óleos essenciais e seus componentes foi testada em diversos alimentos, a citar carne bovina (SKANDAMIS; NYCHAS, 2001; TSIGARIDA et al., 2000), presunto embalado a vácuo (GILL et al., 2002), queijo (MENON; GARG, 2001; SMITH-PALMER et al., 2001), camarão (OUATTARA; SABATO; LACROIX, 2001) e leite (KARATZAS et al., 2001).

A partir dos promissores resultados do óleo essencial em experimentos, o uso 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 (SACCHETTI et al., 2005; OUSSALAH, 2006).

Atualmente, as propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais das plantas, têm despertado interesse pela possibilidade de constituírem uma fonte alternativa para as exigências dos consumidores quanto à utilização de aditivos naturais em alimentos (TASSOU et al., 2000; MENDONÇA, 2004). No entanto, quando a finalidade destes óleos é inibir o crescimento microbiano, as concentrações devem ser maiores do que aquelas utilizadas para realçar o sabor e o aroma dos alimentos.

### 2.3 DESCRIÇÃO BOTÂNICA E ÓLEO ESSENCIAL DE *Croton blanchetianus* Baill

Há cerca de 300 gêneros e 8000 espécies da família Euphorbiaceae, amplamente distribuídas em regiões tropicais e temperadas. Esta é classificada em quatro subfamílias: Phyllanthoideae, Poraneroideae, Ricinocarpoideae e a subfamília Crotonoideae que é dividida em duas tribos: Crotoneae e Euphorbiaceae (PAX; HOFFMAN, 1931).

O gênero *Croton*, é o segundo maior da família Euphorbiaceae e pertence a subfamília Crotonoideae e tribo Crotoneae distribuídas em várias regiões de clima tropical (HELUANI et al., 2000). Amplamente distribuído na flora do Nordeste brasileiro, principalmente na caatinga, que abriga em seu ecossistema uma grande biodiversidade, com um habitat específico para plantas medicinais e aromáticas não encontradas em outras regiões do planeta

(MAIA, 2004). Este gênero é muito importante pela sua utilidade ao indivíduo que vive afastado dos grandes centros populacionais (LORENZI; MATOS, 2002).

Como um dos maiores gêneros de plantas floríferas, o *Croton* é para o Brasil o gênero com maior número de espécies da família, com um total de 350 espécies distribuídas em 29 secções (BERRY, 2006). Compreendem plantas de hábitos heterogêneos que vão desde árvores, arbustos, subarbustos, ervas e trepadeiras (RADULOVIC et al., 2006). Para a Região Nordeste estima-se um total de 52 espécies distribuídas em 18 secções (CORDEIRO; CARNEIRO-TORRES, 2006).

Espécies do gênero *Croton* atraem o interesse para o seu estudo em virtude do amplo uso popular, atividades biológicas e como fonte promissora de novos e interessantes compostos naturais bioativos (AMARAL, 2004). São frequentemente utilizadas na medicina popular, na forma de chás, infusões, cataplasmas e laxativos de diferentes partes das plantas, de várias espécies do gênero (ABREU et al., 2001).

Estudos demonstraram que diferentes espécies do gênero *Croton*, apresentam diversas atividades farmacológicas, tais como: antidiabético (BARBOSA-FILHO et al., 2005); anti-hipertensiva (PALMEIRA-JUNIOR et al., 2006); antifúngica (FONTENELLE et al., 2008); larvicida (BRASIL et al., 2009); antileishmanicida (SOCORRO et al, 2003); antinociceptiva (CAMPOS et al, 2002); antiulcerogênica e citotóxica (ALMEIDA et al, 2003); antimicobacteriana e (THONGTAN et al, 2003); anti-inflamatória (SUAREZ et al, 2003); antiproliferativa (ROSSI et al, 2003); vasorelaxante (GUERRERO et al, 2002); antidiarreica (GURGEL et al., 2001); dentre outras.

O *Croton blanchetianus* Baill (Euphorbiaceae) é popularmente conhecido como marmeleiro, em virtude do tronco e ramos possuir um aspecto geral escuro. Encontra-se em abundância no Nordeste brasileiro, sendo este o principal arbusto colonizador das caatingas sucessionais do Nordeste do Brasil, típico do sertão. Habita principalmente a região entre as bacias do rio São Francisco e Parnaíba (PEREIRA FILHO, 1995; ARAÚJO FILHO et al., 1996). De acordo com Govaert; Frodin & Radcliffe-Smith (2000) a nomenclatura dessa espécie foi reajustada de *Croton sonderianus* Muell. Arg. para *Croton blanchetianus* Baill.

Este tipo de espécie apresenta-se na forma de arbusto nas capoeiras do sertão, ou árvore quando cresce nas matas. Fornece madeira durável devido à sua alta resistência a deteriorização, sendo muito utilizada como lenha para queima, material para cercas de varas e preparação de armadilhas da lagosta. Além de possuir folhas e cascas usadas na medicina popular para tratamento de distúrbios gastrointestinais, reumatismo e dor de cabeça (MATTOS, 1999; CHAVES; REINHARD, 2003).

De acordo com a descrição taxonômica contida no vol. XI da parte II da Flora Brasiliensis, *Croton blanchetianus* Baill é uma planta arbustiva, com ramos pecíolos quase cilíndricos, apresenta folhas triangular-oval ou quase triangular-lanceolada. Os rancemos possuem flores abundantes, a flor feminina é destituída de pétalas e a flor masculina apresenta pétalas obovato. As sementes medem 5mm de comprimento por 4mm de largura e aproximadamente 2mm de espessura (SILVEIRA, 1979).

As espécies de *Croton* têm sido largamente estudadas em relação aos seus constituintes voláteis e não-voláteis. Muitas espécies são produtoras de um grande número de substâncias pertencente às classes dos alcaloides, fenilpropanoides e terpenoides (RANDAU et al., 2004).

O óleo essencial do *C. blanchetianus* apresenta predominância de componentes monoterpenos e sesquiterpenos que possuem propriedades anti-inflamatória, analgésica e antioxidante (TRENTIN et al., 1999; SANTOS E RAO, 2000; ANDRE et al., 2004). Esta planta é rica em diterpenos (MCCHESENEY et al., 1991) beierano, caurano (GONZALEZ et al., 1981) e labdano (ROENGSUMRAM et al., 1999), com atividade biológica diversificada. A partir dos extratos de raiz de *C. blanchetianus*, dois compostos diterpeno foram isolados e descritos por possuir propriedades antibacterianas e antifúngicas (MCCHESENEY et al., 1991).

Pesquisas publicadas com o óleo essencial do *C. blanchetianus* têm demonstrado um efeito antinociceptivo (CARNEIRO LOUREIRO, 2003; AMARAL, 2004; SANTOS et al., 2005), além de outras atividades farmacológicas, como anti-inflamatória, gastroprotetora (AMARAL, 2004) e antimicrobiana (MCCHESENEY et al., 1991). Apresenta também importância na criação de ovinos, apresentando um alto valor nutritivo e boa digestibilidade para o uso em forragens para suplementação animal (ARAÚJO et al., 1996).

O extrato hexânico ou benzênico do cerne ou raízes do *C. blanchetianus* demonstraram possuir atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium smegmatis*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e antifúngica frente à *Candida albicans*, *Sacharomyces cerevisiae* e outros micro-organismos (MCCHESENEY et al., 1991; DOURADO, 2003).

## 2.4 CRESCIMENTO E CONTROLE MICROBIANO EM ALIMENTOS

Os componentes estruturais, orgânicos e inorgânicos, presentes nos alimentos são altamente sensíveis às variações do ambiente, portanto, podem sofrer interferência de uma série de fatores que incluem: calor, frio, luz e outras radiações, oxigênio, umidade, enzimas próprias dos alimentos, micro-organismos (bactérias, bolores e leveduras) e organismos superiores (como insetos, parasitas e roedores), contaminantes industriais e danos ou injúrias físicas ao alimento (POTTER; HOTCHKISS, 2007).

De uma maneira geral, a qualidade dos alimentos pode ser adversamente afetada por alterações ocasionadas pela ação de fatores físicos, químicos ou microbiológicos (LÜCK; JAGER, 2000; FORSYTHE, 2002). Entretanto, o fator microbiológico é o mais importante pela sua capacidade de contaminação, variedade de efeitos que origina e intensidade de alterações que provoca (EVANGELISTA, 2005).

A presença e o crescimento de micro-organismos nos alimentos podem causar deterioração e resultar em uma redução na qualidade e quantidade dos nutrientes (SOLIMAN; BADEAA; 2002) conduzindo a um estado de impropriedade para o consumo humano. Os micro-organismos, quando presentes no alimento, crescem através da utilização de seus constituintes químicos, seja através de via oxidativa ou fermentativa, com a finalidade de obtenção de energia necessária para manutenção da viabilidade da célula microbiana e síntese de componentes celulares (RIEDEL, 2005).

O consumo de alimentos contaminados com alguns micro-organismos patogênicos representa um sério risco de saúde aos seres humanos. *Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, *Escherichia coli* 0157: H7 e *Salmonella* sp. tem sido relatada como os agentes causais de doenças transmitidas por alimentos (RAHMAN; KANG, 2009).

Doenças transmitidas por alimentos (DTAs) são definidas como qualquer doença infecciosa ou de natureza tóxica causada pelo consumo de alimentos ou água contaminados por bactérias, vírus, parasitas, toxinas, prions, agrotóxicos, produtos químicos e metais pesados. Porém, a maioria é de origem microbiana que essencialmente, utiliza-se de dois mecanismos, ou seja, refere-se a uma infecção ou intoxicação (WHO, 2004; BRASIL, 2005).

Um dos mecanismos que determinam como as DTAs são causadas, é por infecção, que ocorre como consequência do consumo de alimentos contaminados com o crescimento de micro-organismos patogênicos, como bactérias, fungos, vírus e parasitas (VATTEM et al., 2004). Além da transferência passiva de agentes patogênicos aos alimentos, o crescimento

ativo de um patógeno também pode ocorrer em alimentos, por exemplo, por causa do armazenamento inadequado, o que leva a um aumento significativo na carga microbiana (MADIGAN et al., 1997).

O número crescente de surtos de doenças causadas por alguns micro-organismos patogênicos em alimentos é uma preocupação tanto para consumidores quanto para a indústria (SHAN et al., 2007). A incidência global das doenças de origem alimentar é difícil de estimar, porém foi relatado que no ano de 2005 aproximadamente 1,8 milhões de pessoas morreram de doenças diarreicas (WHO, 2007).

Desta forma, os consumidores esperam que os alimentos adquiridos de mercado varejista, restaurantes e lojas, sejam seguros, porém vários fatores podem implicar na ruptura do sistema de qualidade e segurança, particularmente de produtos cárneos (DJENANE et al., 2011). Dentre os fatores incluem-se a faixa de pH da carne; a adição de sal, nitrito, açúcar, fumaça (líquida ou natural), acidulantes e o estado da carne (aquecida, fermentada, ou seca) (ALMEIDA, 2005).

Apesar da evolução tecnológica das últimas décadas, quanto às técnicas de conservação e higiene dos alimentos, DTAs têm sido consideradas como um grave problema de saúde pública em escala mundial, sendo os alimentos reconhecidos como o principal vetor das enfermidades entéricas agudas (OLIVEIRA et al., 2003), tendo como agentes mais importante na etiologia das DTAs as bactérias, que têm causado um grande número de surtos e de mortes, seja por ação infecciosa, intoxicação ou toxinfecção (SOUSA, 2003).

Inúmeros micro-organismos tornam-se resistentes aos múltiplos antimicrobianos disponíveis, representando um desafio para o tratamento de doenças e infecções, o que torna premente a necessidade de encontrar novas substâncias com propriedades antimicrobianas a serem utilizadas no combate a esses micro-organismos (DEVIIENNE; RADDI 2002; PEREIRA et al., 2004).

Para a manutenção da qualidade de produtos alimentícios, em especial cárneos, podem ser usados diversos métodos de conservação, como salga, defumação, secagem, refrigeração, radiação, uso adequado de embalagens e fermentação (DABÉS; SANTOS; PEREIRA, 2001). A qualidade de um produto alimentício acabado, bem como a otimização da produção, depende, fundamentalmente da procedência e confiabilidade de seus componentes, ou seja, das matérias-primas, ingredientes e aditivos empregados (LUCINI et al., 2009).

A conservação de alimentos é baseada na busca de produtos com alta qualidade nutricional e estabilidade microbiana e tem sido alcançada pelo controle do crescimento e sobrevivência de micro-organismos deteriorantes e patógenos de origem alimentar (BAYDAR

et al., 2004; BENKEBLIA, 2004). Por um longo tempo, a segurança microbiana dos alimentos tem sido obtida por uso de vários procedimentos físicos e/ou químicos (MARINO; BERSANI; COMI, 2001; DAFERERA; ZIOGAS; POLISSIOU, 2003).

Atualmente, observa-se o interesse em uma menor utilização de conservantes químicos na conservação de alimentos, porque consumidores exigem alimentos mais naturais com baixo impacto sobre o ambiente, que caracteriza o "consumismo verde" (RADHRAKRISHANAN-SRIDHAR, VELUSAMY-RAJAGOPAL, RAMASAMY-RAJAVEL, 2003; NAIR; VASUDEVAN; VENKITANARAYANAN, 2005).

Este panorama tem impulsionado as pesquisas sobre a possível descoberta de produtos vegetais com propriedades antimicrobianas (VALERO, SALMERÓN, 2003; SOUZA, et al. 2005). Mais de 1.340 plantas são conhecidas como potenciais fontes de compostos antimicrobianos, porém poucas destas têm sido cientificamente estudadas (SEIDL, 2000).

Nas práticas de conservação de alimentos, o fato de utilizar antimicrobianos de origem vegetal pode implicar em um impacto organoléptico, causado por alteração do sabor natural dos alimentos, excedendo os limites de sabor aceitável (HSIEH et al, 2001; NAZER et al, 2005). Para conseguir isso, alguns cientistas tentaram usar várias combinações de óleos essenciais (MATAN et al., 2006; FU et al., 2007; GUTIERREZ et al., 2008; GONI et al., 2009), além de adicionar óleos essenciais em alimentos combinados a conservantes químicos ou outros métodos de conservação (ISMAIEL; PIERSON, 1990).

## 2.5 MICRO-ORGANISMOS DE INTERESSE EM ALIMENTOS

### 2.5.1 *Aeromonas hydrophila*

*A. hydrophila* é uma bactéria da família *Aeromonadaceae*, que se caracteriza como espécie bastonete, Gram-negativo, anaeróbica facultativa, medindo cerca de 1 a 3,5 µm de comprimento e largura de 0,3 a 1 µm, não formadora de esporos, móvel, catalase positiva, oxidase positiva, fermentam carboidratos como glicose, frutose, maltose e trealose com produção de ácidos e gás (JOSEPH; CARNAHAN, 2000; ISONHOOD; DRAKE, 2002; LAI et al., 2007).

Os micro-organismos desta espécie são psicrotróficos, ou seja, mesmo apresentando como temperatura ótima para seu crescimento em torno de 28 °C, são capazes de se desenvolver nas temperaturas empregadas na conservação de alimentos, com quatro e sete graus Celsius (MANO; ORDOÑEZ; FERNANDO, 2000; BRAUN; SUTHERLAND, 2005). Dessa forma, a refrigeração dos alimentos, embora proporcione o controle de micro-organismos mesofílicos indesejados, como *S. aureus*, pode favorecer o desenvolvimento de psicrotróficos, como *Aeromonas* spp. (MARCHAND et al., 2007).

Na espécie *A. hydrophila* foram caracterizadas cinco subespécies: *A. hydrophila* subsp. *anaerogenes*, *A. hydrophila* subsp. *dhakensis*, *A. hydrophila* subsp. *hydrophila*, *A. hydrophila* subsp. *proteolytica* e *A. hydrophila* subsp. *ranae* (HARF-MONTEIL et al, 2004).

Este micro-organismo apresenta distribuição ubíqua no ambiente, podendo estar presente nos mais diferentes tipos de matérias-primas e alimentos, como pescado e seus derivados, carnes e seus derivados, leite e seus derivados, vegetais e seus derivados, alimentos manipulados e água (NEYTS et al., 2000; SUÑEN; ARISTIMUÑO; FERNANDEZ-GALIAN, 2003; DASKALOV, 2006).

A grande prevalência de *Aeromonas* no ambiente é uma importante ameaça para a saúde pública, já que as infecções causadas por este gênero geralmente são adquiridas pelo consumo de água e alimento contaminados (SEN; RODGERS, 2004; HUDDLESTON; ZAC; JETER, 2006; PALÚ et al., 2006). Em 1998, *Aeromonas hydrophila* foi adicionada à Lista de Contaminantes da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA-Environmental Protection Agency), estabelecendo como prioridade sua pesquisa em água potável, incluindo a avaliação da ocorrência em água pública potável sob o regulamento da UCMR (Unregulated Contaminant Monitoring Regulation) (EPA, 2006).

Quando ocorre a transmissão ao homem, pode causar doenças diarreicas e gastrointestinais mais frequentemente do que geralmente é observado (JOSEPH; CARNAHAN, 2000). Entretanto, o patógeno está relacionado também a quadros de septicemia, síndrome urêmica hemolítica, peritonite, infecção respiratória e feridas cutâneas (JANDA; ABBOTT, 1998). Existem determinados grupos considerados de risco quanto à infecção por *A. hydrophila*, como crianças, idosos, imunodeprimidos (ISONHOOD; DRAKE, 2002) e imunocompetentes (CLARK; CHENOWETH, 2003).

Embora sua participação como agente etiológico de doenças veiculadas por alimentos seja questionada, esta bactéria foi isolada em fezes de indivíduos acometidos por infecções alimentares. Atualmente, sua principal característica é a capacidade de causar a deterioração em alimentos. Micro-organismos desta espécie são potenciais produtores de exoenzimas

termorresistentes, como lipases e proteases. Estes metabólitos, mesmo tendo a sua estrutura terciária danificada durante o processo de pasteurização, são capazes de reorganizar a sua estrutura tridimensional, tornando-se novamente ativos e passíveis de deteriorar os produtos posteriormente obtidos (CHEN; DANIEL; COOLBEAR, 2003; BRAUN; SUTHERLAND, 2005).

Em termos gerais *A. hydrophila* parece não resistir aos tratamentos usuais executados no processamento de alimentos. Esses organismos são termosensíveis, não crescem em pH abaixo de 5, ou em concentração de NaCl acima de 3,5 %, sobretudo em combinação com polifosfatos (ISONHOOD; DRAKE, 2002).

### 2.5.2 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* pertence à família *Enterobacteriaceae* e é predominante da microbiota do trato intestinal de humanos e de outros animais, e em função disso, é utilizada como indicador de contaminação de origem fecal em água e alimentos (AMÂNCIO; PEREIRA; CARVALHO, 2003). É classificada como bastonete reto, Gram-negativo, não esporogênica, móvel (flagelos peritríquios) ou imóvel e anaeróbia facultativa. Fermenta lactose e outros carboidratos, produzindo ácido pirúvico que é convertido em ácido láctico, acético ou fórmico com produção de CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>, reduz nitrato a nitrito e é oxidase negativa. Produz usualmente o indol, apresenta reação negativa de voges-proskauer e positiva para o vermelho de metila e não utiliza o citrato como única fonte de carbono. É produtora de catalase e lipase, hidrolisa uréia, mas é negativa para a produção de H<sub>2</sub>S (HOLT et al., 1994; TRABULSI, 2008).

O gênero *Escherichia* é composto por cinco espécies: *E. coli*, *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermannii* e *E. vulneris*, sendo a espécie *E. coli* considerada como destaque (KUHNERT; BOERLIN; FREY, 2000; RIBEIRO, 2006). É um mesófilo típico capaz de se desenvolver entre 7 e 42 °C sendo 37 °C a temperatura ótima, embora existam bactérias que possam se multiplicar a 4 °C. Não apresenta termoresistência, sendo destruído a 60 °C em poucos segundos, mas é capaz de resistir por longo tempo em temperatura de refrigeração. O pH próximo do neutro propicia condições ótimas para o seu desenvolvimento (KONEMAN et al., 2008; GERMANO; GERMANO, 2008).

*Escherichia coli* faz parte da flora intestinal do homem e animais de sangue quente. Entretanto, certos subgrupos de *E. coli* apresentam fatores de virulência que os tornam capazes de causar doenças intestinais e extraintestinais (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Toxinas e mecanismos de adesão são os fatores de virulência mais comumente encontrados em *E. coli*. Algumas toxinas são intimamente relacionadas com determinados sorotipos desta bactéria (KUHNERT; BOERLIN; FREY, 2000).

A *E. coli* compreende grande número de grupos e tipos sorológicos, verificados por meio de antisoros preparados contra as três variedades de antígenos que ocorrem na espécie, ou seja, os antígenos somáticos (O), capsulares (K) e flagelares (H). São conhecidos até o momento 174 antígenos O, 100 antígenos K e 157 antígenos H. Nem todas as estirpes de *E. coli* provenientes do intestino, ou de qualquer outro local do organismo, apresentam os três tipos de antígenos ao mesmo tempo (TRABULSI et al., 2008). A combinação específica entre antígenos O e H é que define o sorotipo (NATARO; KAPER, 1998).

Em função das manifestações clínicas, fatores de virulência e mecanismos pelos quais causam a doença, os subgrupos de *Escherichia coli* responsáveis por diarreia, podem ser subdivididos em seis patotipos: *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* com aderência difusa (DAEC). Há também patotipos não causadores de diarreia, mas que causam infecções extraintestinais (EXPEC) (RUSSO; JOHNSON, 2000), septicemia e meningite (MNEC) e, infecções extraintestinais em unidades de tratamento intensivo (UPEC) (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; CAPRIOLI et al., 2005).

### 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).

A *Listeria monocytogenes* trata-se de um bastonete Gram-positivo, aeróbico, intracelular e anaeróbico facultativo, amplamente distribuído no meio ambiente e agente

etiológico da listeriose humana e de animais (FRANCO; LANDGRAF, 2008). Apresenta características psicrotróficas, e pode desenvolver-se e multiplicar-se em alimentos mantidos sob temperaturas de refrigeração (DYKES, 2003). Essa bactéria também é capaz de sobreviver e multiplicar-se em alimentos com embalagens a vácuo, em atmosfera modificada e em ambientes com pouca atividade de água, medidas comumente utilizadas como técnicas de conservação (GUDBJÖRNSDÓTTIR et al., 2004). Ainda apresenta grande resistência a agentes antimicrobianos e substâncias químicas, além de ser capaz de formar biofilmes sobre várias superfícies, o que torna difícil sua eliminação (TAKHISTOV; GEORGE, 2004).

Alimentos contaminados são as maiores fontes de infecção por *Listeria monocytogenes* e o trato gastrointestinal é o sítio primário de entrada da bactéria no organismo hospedeiro (VASQUES-BOLAND et al., 2001). Sendo frequentemente encontrada em carnes e produtos cárneos (MARTÍN et al., 2004; BENKERROUM et al., 2005), além de produtos vegetais e leite cru, destacando-se os produtos prontos para o consumo (JEMMI; STEPHAN, 2006; MEAD et al., 2006; SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007).

*Listeria monocytogenes* é o agente etiológico da listeriose, uma infecção severa, a qual é veiculada, principalmente por alimentos e provoca, entre outras enfermidades, encefalites, septicemias, meningites e abortos (DUSSURGET; PIZARRO-CERDA; COSSART, 2004). Geralmente, atinge idosos, pessoas imunocomprometidas ou com doenças crônicas, bem como mulheres grávidas. Em relação às demais DTAs, a listeriose, na maioria das vezes, não evolui para sintomatologia gastroentérica (WALLS; BUCHANAN, 2005). A enfermidade apresenta baixa incidência, quando comparada com outras DTAs, no entanto, a elevada taxa de mortalidade, ao redor de 20-30%, é alarmante do ponto de vista da saúde pública (GAHAN; HILL, 2005).

A dose infecciosa de *L. monocytogenes* não está estabelecida, mas estima-se que varia de  $10^2$  a  $10^9$  unidades formadoras de colônias (UFC) por grama do alimento ingerido, porém pode ser mais baixa em indivíduos imunocomprometidos (JEMMI; STEPHAN, 2006) e pacientes com acidez gástrica diminuída ou que passaram por cirurgia de úlcera (DONNELLY, 2001). O período de incubação também não está definido, mas estima-se que pode ser de até três semanas (POSFAY-BARBE; WALD, 2009).

O processo da infecção por *L. monocytogenes* requer a expressão de fatores de virulência específicos (JEMMI; STEPHAN, 2006). Vários fatores já foram descritos, como as internalinas, que são responsáveis pela invasão das células epiteliais e pelo tropismo ao tecido. A listeriolisina O (LLO) e duas fosfolipases C (fosfotidilinositol – PI-PLC e

fosfotildicolina – PC-PLC) responsáveis pela lise dos fagossomos da célula hospedeira e pela multiplicação intracelular do patógeno. A proteína act-A responsável pela propagação célula a célula, motilidade. Além desses, já foram descritos outros fatores como proteína de ligação da fibronectina (responsável pelo processo de colonização do fígado e intestino), lecitinases e proteases (POSFAY-BARBE; WALD, 2009).

A *Listeria monocytogenes*, possui elevada resistência fisiológica, sendo difícil controlar ou prevenir sua contaminação em alimentos, principalmente naqueles que não sofrem tratamento térmico durante o processamento. Sua capacidade de colonização, multiplicação e formação de biofilmes nos equipamentos de processamento de alimentos, tornam este micro-organismo uma ameaça à indústria (RÓVIK et al., 2003). Assim, cuidados especiais, como adoção de boas práticas de higiene durante as etapas de produção de alimentos, associados às técnicas de preservação do produto final tornam-se imprescindíveis (BERSOT et al., 2001; DEVLIEGHIERE; VERMEIREN; DEBEVERE, 2004).

#### 2.5.4 *Pseudomonas fluorescens*

*Pseudomonas* é um vasto gênero da família *Pseudomonaceae*, que na sua maioria são micro-organismos ambientais, podendo infectar diversas espécies de plantas e animais, sendo somente algumas espécies patogênicas para o ser humano. O gênero *Pseudomonas* inclui espécies fluorescentes (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, entre outras) e não fluorescentes (*P. stutzeri*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. alcaligenes*, entre outras) (PALLERONI, 1998).

A família *Pseudomonadaceae* é constituída por um grupo grande de bactérias Gram-negativas não fermentadoras de glicose. Dois esquemas foram propostos para classificar organismos desta família. Um primeiro esquema, proposto por Gillardi (1991), é baseado nas características fenotípicas e divide os micro-organismos em sete grandes grupos: *fluorescens*, *stutzeri*, *alcaligenes*, *pseudomallei*, *acidovorans*, *facili-delafieldii* e *diminuta*. Recentes estudos filogenéticos baseados na análise da sequência de nucleotídeos da porção 16S do RNA ribossômico levaram a uma nova descrição do gênero *Pseudomonas* e limitaram as espécies de acordo com a homologia do RNA ribossômico em cinco grupos. O gênero *Pseudomonas* pertence ao grupo I, que incluem as espécies *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida* (KERSTERS et al., 1996; ANZAI et al., 2000).

*Pseudomonas* é um gênero das gama-proteobactérias tendo por características comuns: Gram-negativas; aeróbias estritas (atualmente algumas espécies já foram identificadas como sendo anaeróbias facultativas); em forma de bastonete; não formadoras de esporos e possuindo um ou mais flagelos polares para motilidade (GARRITY, 1984; ANZAI et al., 2000).

O gênero *Pseudomonas* é capaz de crescer a baixas temperaturas em função de seu potencial deteriorador, destaca-se a espécie *Pseudomonas fluorescens*, que é frequentemente isolada de ambientes da indústria de alimentos (PINTO, 2004). Esta bactéria pode adaptar-se rapidamente a diferentes condições ambientais e é responsável pela perda de aceitabilidade de alimentos refrigerados pelos consumidores por causa de uma aparência indesejável, produção de proteases e lipases termoestáveis, as quais são responsáveis por aromas e odores desagradáveis em produtos lácteos, mesmo após a morte dos micro-organismos pela pasteurização e, ainda, produção de pigmentos na deterioração de ovos (MASSON et al., 2002; FORSYTHE, 2002). Além disso, pode ser encontrada no solo e na água e é comumente a causa de deterioração de alimentos como, por exemplo, ovos, carnes curadas, peixes, vegetais e leite (MASSON et al., 2002).

*Pseudomonas fluorescens* é conhecida pela sua rápida formação de biofilmes e alto potencial de deterioração de produtos refrigerados (KIVES; ORGAZ; SANJOSE, 2005). Possui tempo de geração curto em temperaturas de refrigeração, o que lhe confere vantagens em relação a outras bactérias Gram-negativas. Pesquisas mostram que o tempo de geração de *P. fluorescens* é de 30,2 horas, entre 0 °C e 2 °C (RIBEIRO-FURTINI, 2005).

### **2.5.5 *Salmonella* Enteritidis**

*Salmonella* Enteritidis que pertence à família *Enterobacteriaceae*, é um bacilo Gram-negativo, não formador de esporos, anaeróbio facultativo, catalase-positivo, oxidase-negativo, geralmente móveis por flagelos peritríquios, com crescimento ótimo a 37 °C. São termosensíveis e destruídos facilmente por temperaturas de pasteurização (ADAMS; MOSS, 2000). Embora *Salmonella* Enteritidis possa crescer em pH 5,2 e temperatura de 46,2 °C, 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 (JAY, 2005). Nas condições ótimas de disponibilidade

de nutrientes, atividade de água, temperatura e pH, a bactéria pode multiplicar-se a cada 20 minutos (ABUSHELAIBI et al., 2003).

A classificação do gênero *Salmonella* segue o esquema Kauffmann-White que divide o mesmo em duas espécies, *S. enterica* e *S. bongori*. A *S. enterica* apresenta seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. *Salmonella bongori* apresenta uma única subespécie, a *bongori*. A partir deste nível as salmonelas são classificadas em sorovares e agrupadas de acordo com seus antígenos somáticos. Conforme Doyle e Cliver (1990), o Manual Bergey classifica as salmonelas em 50 grupos, que recebem letras do alfabeto, A, B, C1, C2, D, etc., baseados na composição do antígeno somático, sendo que 98% das salmonelas isoladas pertencem aos 12 primeiros grupos (POPOFF; BOCKEMUHL; GHEESLING, 2003). Atualmente são conhecidos 2579 sorovares do gênero *Salmonella*, baseados em reações bioquímicas e sorológicas (GRIMONT; WEILL, 2007).

A maioria dos sorovares de *Salmonella* responsáveis pelas enfermidades pertence à espécie *S. enterica* subsp. *Enterica* (POPOFF; LE MINOR, 2005). Os sorovares associados às infecções humanas variam de acordo com a região estudada, entretanto os mais comuns são *S. Enteritidis* e *S. typhimurium* (GALANIS et al., 2006).

A capacidade de *Salmonella* spp. causar a doença depende de vários fatores de virulência, como plasmídeos, toxinas, fimbrias e flagelos. Embora os elementos genéticos envolvidos na virulência não estejam suficientemente esclarecidos, sabe-se que a maioria dos genes de virulência localiza-se em regiões específicas do cromossomo bacteriano, denominadas de ilhas de patogenicidade (*Salmonella* Pathogenicity Island – SPI) (VAN ASTEN; VAN DIJK, 2005).

As salmoneloses podem ser graves, especialmente em crianças, idosos e imunodeprimidos, uma vez que a bactéria pode atingir a corrente sanguínea e provocar infecções extraintestinais como septicemia, eritema nodoso, meningite, osteomielite, pneumonia e outras enfermidades (D'AOUST; MAURER, 2007). O risco de doenças invasivas causadas por *Salmonella* (sorovares ubíquos) pode ser de duas a seis vezes mais alto do que o de infecções ocasionadas por outros patógenos de origem alimentar (HELMS; SIMONSEN; MOLBAK, 2006), assim como é maior também a ocorrência de óbitos (HUGHES; GILLESPIE; O'BRIEN, 2007).

Os principais sintomas das salmoneloses são dor abdominal, diarreia, vômito e febre (D'AOUST; MAURER, 2007) e em média, ocorrem de 12 a 36 horas após o consumo de água ou alimentos contaminados. Entretanto, esse período de incubação pode variar em função da quantidade de células viáveis ingeridas e do sorovar envolvido (SALYERS;

WHITT, 1994). A dose infectante em pessoas saudáveis também varia de acordo com o sorovar e alimento envolvidos, podendo ser de 30 até  $10^9$  micro-organismos (FOLEY; LYNNE, 2008).

Nos últimos anos, o número de surtos causados por salmonela vem aumentando consideravelmente, tanto em países em desenvolvimento como nos desenvolvidos. *Salmonella* spp. é um dos patógenos mais frequentemente associados à doenças de origem alimentar, em países como: Áustria (MUCH et al., 2009); Brasil (GEIMBA et al., 2004; VAN AMSON; HARACEMIV; MASSON, 2006); Estados Unidos (GERNER-SMIDT; WHICHARD, 2007); Espanha (DOMÍNGUEZ et al., 2007); Japão (KUBOTA et al., 2008).

### 2.5.6 *Staphylococcus aureus*

Os *Staphylococcus aureus* pertencem à família *Micrococcaceae* (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2006) e é uma espécie de bactéria que se apresenta como cocos Gram-positivos reunidos em cachos, anaeróbio facultativo, produtor de catalase, oxidase negativo, imóvel e coagulase positivo (QUINN et al., 2005; KONEMAN et al., 2008). São muito resistentes devido à sua relativa capacidade termorresistente de mater-se sob condições de alta pressão osmótica e poder permanecer viáveis por longos períodos em objetos secos, características estas que permitem ao *S. aureus* estar presente em qualquer ambiente humano (TORTORA et al., 2000; TALLY; BARG, 2002). É considerado como a eubactéria mais halotolerante não halófila, crescendo até  $a_w$  (atividade de água) de 0,86 (GUTIERREZ, et al., 1995; WIJNKER et al., 2006).

O *S. aureus* é um agente que provoca doenças mais frequentes e mais variadas do que qualquer outro patógeno, pois vivem nas pessoas, em sua roupa de cama, vestuário, maçaneta de portas, com frequência colonizam a parte externa das narinas, sendo encontrados em cerca de 30 % dos indivíduos normais e podem ainda ser encontrados transitoriamente na pele, orofaringe e nas fezes humanas (TALLY; BARG, 2002; TORTORA et al., 2000).

As patologias mais graves causadas por *S. aureus* são: abscessos, bacteriemia, infecções do sistema nervoso central, endocardites, osteomielites e diversas síndromes, como

a síndrome da pele escaldada, a intoxicação alimentar e a síndrome do choque tóxico (GILL et al., 2005; BANNERMAN; PEACOCK, 2007).

O *Staphylococcus aureus* é um dos agentes patogênicos mais comuns, responsáveis por surtos de intoxicação alimentar. As peculiaridades do seu habitat tornam sua presença amplamente distribuída na natureza, sendo transmissíveis aos alimentos por manipuladores, na maioria, portadores assintomáticos, e pelos animais (BALABAN; RASOOLY, 2000).

A intoxicação alimentar estafilocócica é atribuída à ingestão de enterotoxinas produzidas e liberadas pela bactéria durante sua multiplicação no alimento. É caracterizada por sintomas gastrointestinais como náusea, vômito, dores abdominais e diarreia em humanos (SCHERRER et al., 2004). A enterotoxina é termoestável, podendo permanecer no alimento mesmo após o cozimento, favorecendo a ocorrência da intoxicação (ALCARÃS et al., 1997).

A intoxicação causada por *S. aureus* é multifatorial, geralmente resultado da produção simultânea de vários fatores de virulência. Esses fatores têm um amplo espectro de patogenicidade, atuando de modo sinérgico e coordenado, incluindo destruição da barreira epitelial, inibição da opsonização por anticorpos e complemento, interferência com a quimiotaxia de neutrófilos e inativação de peptídeos antimicrobianos (IWATSUKI et al., 2006; TRISTAN et al., 2007).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 LOCAL DO EXPERIMENTO

A extração e análises físico-químicas do óleo essencial foram realizadas no Laboratório Multidisciplinar de Pesquisas Ambientais (LAMPA) do Centro de Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande (CSTR/UFCG). Para a análise química, foi utilizado o Laboratório de Pesquisas de Produtos Naturais da Universidade Regional do Cariri (LPPN/URCA), Crato-Ceará. As análises da atividade antimicrobiana foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do Hospital Veterinário do CSTR/UFCG, Campus Patos, e no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Centro de Tecnologia da UFPB.

#### 3.2 MATÉRIA-PRIMA PARA OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

O material destinado à produção de óleo essencial consistiu-se de amostras foliares verdes de marmeleiro (*Croton blanchetianus* Baill), coletadas aleatoriamente de plantas da zona rural, localizadas na Fazenda NUPEARIDO do CSTR/UFCG, situada na mesorregião do sertão paraibano, à 6 Km a sudoeste do município de Patos – PB, entre as coordenadas geográficas de latitude 07° 05' 10" S e longitude 37° 15' 45" W. As coletas foram realizadas no período chuvoso, de fevereiro a março, e identificada pela equipe funcional do herbário da Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas (CSTR/UFCG) Campus Patos, onde exsicata com o número de registro 1462 encontra-se depositada.

#### 3.3 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

O processo de extração do óleo essencial dos foliares de marmeleiro foi realizado pelo processo de hidrodestilação, utilizando o Sistema Extrator de Clevenger acoplado a um balão

de fundo redondo de 3000 mL e uma manta elétrica como fonte geradora de calor, conforme modelo citado na Farmacopéia Brasileira (1999). Na extração do óleo essencial, pesou-se 150g de amostra para cada extração, juntamente com 2500 mL de água destilada, os quais foram submetidos a uma temperatura de extração de 100 °C durante um período de 90 minutos após o início da ebulição. A fração de óleo essencial foi separada da água por diferença de densidade e, a seguir seco por meio de percolação em sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) em funil/papel de filtro qualitativo e armazenada em recipiente de vidro âmbar hermeticamente fechado, em temperatura de refrigeração. O rendimento de óleo, expresso em percentual, foi mensurado no próprio extrator em intervalos de 5 minutos levando em consideração a quantidade em massa (g) de material foliar utilizado na extração (SANTOS et al., 1998).

### 3.4 COMPOSIÇÃO QUÍMICA

A análise da composição química do óleo essencial de marmeleiro foi realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), utilizando um cromatógrafo 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 24mL/min; fluxo de portador de 24mL/min; pressão de 107,8 kPa; e a temperatura de aquecimento da coluna foi programada para 60 °C (2min) – 180 °C (1 min) a 4 °C/min e de 180 – 260 °C a 10°C/min.

A identificação dos componentes foi realizada por comparação entre seu respectivo espectro de massa com os padrões registrados na base de dados de referência da biblioteca Wiley 229, 2002 e entre os tempos de retenção calculados com valores da literatura especializada.

### 3.5 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DO *Croton blanchetianus* Baill

Na caracterização das propriedades físico-químicas do óleo essencial, foram determinados o índice de refração, a densidade relativa, a solubilidade em etanol a 90 %, cor e aparência (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1999).

#### 3.5.1 Determinação da densidade relativa $^{20}d_{20}$

A densidade relativa do óleo essencial de *Croton blanchetianus* Baill foi determinada com o emprego de um picnômetro de 1,0 mL previamente seco, tarado e aferido. Em seguida era cheio com a amostra do óleo essencial a 25 °C e então pesado.

#### 3.5.2 Determinação do índice de refração $^{20}_nd$

Os índices de refração dos óleos essenciais foram obtidos em refratômetro de Abbé, em função da luz de sódio no comprimento de onda de 589,3 nm e a temperatura de 25 °C (AOAC, 2000). A calibração do aparelho foi feita com água destilada, cujo índice de refração é de 1,33325 a 25 °C.

#### 3.5.3 Solubilidade em etanol (90 %)

Para esse teste, foi utilizado balão volumétrico de 10 mL contendo volume constante do óleo essencial, sobre o qual era adicionado proporcionalmente volume crescente da mistura de álcool/água destilada a 90 % (v/v) até a sua completa solubilização.

### 3.5.4 Cor

A técnica utilizada foi visual, comparando-se a cor do óleo essencial com as cores conhecidas.

### 3.5.5 Aparência

A técnica empregada, também nesse caso, foi a visual, na qual se fez uma comparação da essência no que diz respeito à sua transparência ou limpidez por testes sensoriais.

## 3.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Para a realização dos testes antimicrobianos do óleo essencial de *Croton blanchetianus* Baill foram realizadas as metodologias de difusão em placas (*screening*), Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM), Viabilidade bacteriana e aplicação do óleo essencial em alimento.

### 3.6.1 Estirpes bacterianas

As estirpes utilizadas como micro-organismos teste nos ensaios antimicrobianos foram: *Aeromonas hydrophila* INCQS 7966, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 11253, *Salmonella* Enteritidis CDC 49812 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, as quais foram obtidas através da coleção de micro-organismos de referência do Instituto Nacional de Controle de Qualidade (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) do Rio de Janeiro, Brasil. Os inóculos utilizados nos ensaios antimicrobianos foram obtidos de culturas dos micro-organismos cultivadas em Ágar Mueller Hinton a 28 °C para *A. hydrophila* e *P. fluorescens* e a 37 °C para os demais micro-

organismos, por aproximadamente 18 horas. Uma alíquota de cada cultura foi tomada com o auxílio de uma alça bacteriológica e diluída em solução salina ( $0,85 \text{ g.}100\text{mL}^{-1}$ ) esterilizada, sendo em seguida, a turvação da suspensão obtida ajustada a turbidez do tubo 0,5 da escala de McFarland, representando um inóculo aproximado de  $10^8$  Unidades Formadoras de Colônias por mL ( $\text{UFC.mL}^{-1}$ ) (FROMTLING et al., 1983; DRUTZ, 1987; BELÉM, 2001).

### **3.6.2 Difusão em Placas (screening)**

Nesse teste prévio da ação antimicrobiana do óleo essencial de marmeleiro, foram testadas as estirpes de *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella* Enteritidis e *Staphylococcus aureus* que são micro-organismos de interesse em alimentos, de acordo com a metodologia modificada do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, antigo National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS) M2-A8, utilizando-se 100  $\mu\text{L}$  de suspensão dos micro-organismos, contendo cerca de  $10^8 \text{ UFC.mL}^{-1}$  para inocular as placas. Na realização dos testes foram utilizados discos de papel Watmann número 3, com 6 mm de diâmetro, que foram colocados sobre o meio de cultura Ágar Mueller Hinton. Para cada micro-organismo, um volume correspondente a 20  $\mu\text{L}$  do óleo foi testado em cada disco, no final do período de incubação foi 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 testes foram realizados em triplicata, e os antibióticos penicilina (10  $\mu\text{g/mL}$ ) e neomicina (10  $\mu\text{g/mL}$ ) foram utilizados como referência para as bactérias.

### **3.6.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)**

A CIM do óleo essencial de marmeleiro, frente a cada estirpe teste, foi determinada através da técnica de macrodiluição em caldo. Para tal, foram preparados tubos de ensaio contendo 5 mL de Caldo Mueller Hinton duplamente concentrado adicionados de 0,15  $\text{g.}100\text{mL}^{-1}$  de ágar bacteriológico e suplementados com 4 mL das diferentes concentrações

dos antimicrobianos. Em seguida, foi adicionado de 1 mL do inóculo das bactérias teste, sendo o sistema incubado a 35-37 °C por 24 horas. Ao término do período de incubação, a mais baixa concentração (maior diluição) do antimicrobiano que não apresentou crescimento microbiano visível (turvação) 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 Mueller Hinton inclinado, por 24-48 horas a 37 °C. A CBM foi considerada como a menor concentração, na qual a bactéria teste não apresentou capacidade de crescimento em Caldo Mueller Hinton adicionado do óleo essencial, bem como não foi capaz de crescer quando inoculadas em Ágar Mueller Hinton. Como ensaios controle, foram utilizados sistemas sem adição de antimicrobianos (FU et al., 2007).

#### **3.6.4 Influência do óleo essencial sobre a cinética microbiana**

O estudo de interferência dos óleos essenciais sobre a cinética de crescimento microbiano foi realizado através do método de contagem de células viáveis, com as estirpes que apresentaram perfil de sensibilidade ao óleo essencial de marmeleiro no experimento da CIM e CBM. Para tanto foi observada a viabilidade das bactérias quando expostas a diferentes concentrações (CIM/2, CIM, CIM x 2) do óleo essencial testado por diferentes intervalos de tempo (0, 30, 60, 120, 240, 360, 480 e 600 minutos) a 37°C. Inicialmente, 1 mL da suspensão bacteriana foi inoculado em 4mL de Caldo Mueller Hinton com concentração ajustada para 10 mL, em seguida, foi adicionado 5 mL da solução do óleo essencial (2 x concentração desejada). O sistema foi incubado a 35-37 °C. Nos intervalos de 0, 30, 60, 120, 240, 360, 480 e 600 minutos pós-incubação, uma alíquota de 1,0 mL da suspensão foi diluída seriadamente ( $10^{-1} - 10^{-5}$ ) em água peptonada ( $0,1 \text{ g} \cdot 100\text{mL}^{-1}$ ) esterilizada e uniformemente semeada em placa de Petri contendo Ágar Mueller Hinton. No experimento controle, a solução do óleo essencial foi substituída por 5 mL de 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<sup>-1</sup> (BARROS et al., 2009).

### 3.6.5 Aplicação do óleo essencial em microsistema de conservação de alimento

Porções de carne bovina do tipo patinho, de alto teor protéico e baixo índice de gordura, foram cortados em cubos de 3 cm<sup>3</sup> e acondicionados em Erlenmeyer com tampas, em seguida esterilizados em autoclave (121 °C/15 minutos a 121 atm). Após a esterilização, as porções de carne foram inoculadas com uma suspensão microbiana de *Listeria monocytogenes* (micro-organismo que apresentou maior atividade antimicrobiana *in vitro*) de acordo com o seguinte procedimento: os pedaços de carne foram individualmente imersos em 50 mL do inóculo bacteriano (10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> preparado em solução salina estéril 0,85 g.100mL<sup>-1</sup>) e agitados com bastão de vidro estéril por 1 minuto com a finalidade de garantir uma inoculação homogênea. Posteriormente, os pedaços de carne foram aleatoriamente divididos em cinco grupos e imersos durante 30 segundos (1:4 p/v) em diferentes soluções: (I) controle - imerso em água destilada estéril; (II) imerso em solução contendo a CIM do óleo essencial; (III) imerso em solução contendo a CIM x 2 do óleo essencial; (IV) imerso em solução contendo a CIM x 5 do óleo essencial e (V) imerso em solução contendo a CIM x 10 do óleo essencial. As porções de carne foram acondicionadas em placas de Petri estéreis, seladas e armazenadas sob refrigeração (7 °C ± 1 °C). Nos períodos de 0, 24, 48, 72 e 96 horas de armazenamento, as amostras de carne foram submetidas a contagem UFC de *Listeria monocytogenes* de acordo com metodologia descrita por Oliveira et al. (2010). Os resultados foram realizados em triplicata e expressos em log de unidades formadoras de colônias por grama de carne (log UFC.g<sup>-1</sup> de carne) como média dos três resultados paralelos.

### 3.6.6 Análises estatísticas

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 - Composição química e atividade antibacteriana *in vitro* do óleo essencial das folhas de *Croton blanchetianus* Baill

Escrito segundo normas da revista:

**Food Chemistry**

### **Chemical composition and antibacterial activity of *Croton blanchetianus* Baill essential oil leaves**

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

<sup>a</sup> Departamento de Engenharia de Alimentos, Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba, 58059-900 João Pessoa, Paraíba, Brasil.

<sup>b</sup> Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Campus Patos, Paraíba, Brasil.

<sup>c</sup> Laboratório de Microbiologia, Hospital Veterinário, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Campus Patos, Paraíba, Brasil.

<sup>d</sup> Laboratório de Pesquisas de Produtos Naturais, Universidade Regional do Cariri, Crato, Ceará, Brasil.

#### **Resumo**

O óleo essencial das folhas de *Croton blanchetianus* Baill foi analisado em relação à composição química e à atividade antibacteriana *in vitro*. Foram identificados 14 constituintes em uma mistura complexa de monoterpenos (59,43 %) e sesquiterpenos (40,56 %). Os principais componentes encontrados nas folhas foram limoneno (25,70 %),  $\alpha$ -pineno (16,32 %) e biciclogermacreno (13,00 %). O óleo essencial exibiu atividade antimicrobiana contra três estirpes de bactérias testadas (*L. monocytogenes*, *A. hydrophila* e *S. Enteritidis*), os resultados revelam que a concentração inibitória mínima (CIM) variou de 1,25 - 40  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ , e zonas de inibição em ensaio em disco de papel de 10 – 12 mm, sugerindo a necessidade de pesquisas para estabelecer potencial de uso do óleo essencial da espécie vegetal estudada como antimicrobiano natural na indústria de alimentos.

**Palavras-chave:** óleo essencial, *Croton blanchetianus* Baill, atividade antimicrobiana, análise de CG/EM

## 1 Introdução

O gênero *Croton* pertence à família Euphorbiaceae e contém cerca de 1.250 espécies de ervas, subarbustos, arbustos e árvores (Govaerts, Frondin & Radcliffe-Smith, 2000). As espécies estão distribuídas principalmente nas regiões tropical e subtropical, de clima seco e semi-árido (Carneiro-Torres et al., 2011). No Brasil, existem mais de 300 espécies de *Croton*, predominantemente na região semi-árida do Nordeste (Caruzo et al., 2008).

*Croton blanchetianus* Baill (sinônimo *Croton sonderianus* Müell Arg.) (Govaerts, Frondin & Radcliffe-Smith, 2000), conhecido popularmente como "marmeleiro preto", é um arbusto bastante difundido e cultivado no Nordeste do Brasil. As espécies deste tipo fornecem madeira para fazer cercas, construção de armadilhas para lagostas ou para outros usos que requerem uma madeira de grande durabilidade devido à sua resistência à degradação. Por possuir um alto teor de óleo essencial cuja concentração pode variar de 0,5% a 1,5% nas folhas e cascas, o marmeleiro preto vem sendo utilizado, através da medicina popular, pelo indivíduo que vive afastado dos grandes centros populacionais, como infusão ou pela simples mastigação, no tratamento de distúrbios gastrintestinais, reumatismo e cefaleia (Dourado & Silveira, 2005; Chaves & Reinhard, 2003).

O interesse na investigação de novos antimicrobianos em plantas resulta da grande variedade de compostos secundários, como a cumarina, flavonoides, terpenoides, alcaloides e taninos, com ações farmacológicas diversas presentes nos vegetais (Cowan, 1999). Nesse sentido, a composição química e os efeitos biológicos de óleos essenciais de várias espécies vegetais, incluindo propriedades antimicrobianas, têm despertado atenção pela comunidade, com vistas à estabelecer seus potenciais de aplicação em produtos alimentícios diversos (Burt, 2004; Bakkali, Averbeck, Averbeck & Idaomar, 2008).

O óleo essencial obtido de *Croton blanchetianus* Baill tem apresentado atividades farmacológicas, incluindo efeito antiespasmódico (Pinho-da-Silva et al., 2010), antinociceptiva (Santos et al., 2005), atividades anti-inflamatória e gastroprotetora (Amaral, 2004), além de propriedades antibacteriana e antifúngica a partir de compostos diterpenos isolados de extratos das raízes desta planta (McChesney et al., 1991). O objetivo deste estudo foi identificar a composição química e avaliar a atividade antibacteriana do óleo essencial de folhas do *Croton blanchetianus* Baill contra bactérias patogênicas de origem alimentar.

## **2 Materiais e Métodos**

### **2.1 Material vegetal**

Folhas frescas de *Croton blanchetianus* Baill, popularmente conhecido como “marmeleiro preto”, foram coletadas no município de Patos (7°05’10” S latitude, 37°15’45” W longitude), situado na mesorregião do sertão paraibano, Brasil, no período de fevereiro a março de 2011. A espécie foi identificada por comparação com espécimes do herbário e uma exsicata (n° 1462) foi depositada no herbário da Universidade Federal de Campina Grande, Patos, Paraíba, Brasil.

### **2.2 Extração do óleo essencial**

A extração foi realizada através de hidrodestilação por 2 horas, O teste foi realizado em triplicata para cada amostra de 150 g de folhas frescas. Após a secagem com sulfato de sódio anidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) para a retirada dos últimos vestígios de água, foram então armazenadas em frascos de vidro escuro a 4 ° C, por um período não superior a 90 dias, até a realização das análises químicas e estudos antibacterianos. O rendimento de óleo, expresso em percentual, foi mensurado no próprio extrator em intervalos de 5 minutos levando em consideração a quantidade em massa (g) de material foliar utilizado na extração (Santos et al., 1998).

### **2.3 Determinação físico-química do óleo essencial**

A solubilidade do óleo essencial em álcool foi determinada conforme preconizado na Farmacopeia Brasileira (1999). O índice de refração foi determinado em refratômetro do tipo ABBE (Analytik Jena<sup>®</sup>, Jena, Alemanha) a 20 °C, e a densidade relativa foi determinada segundo procedimentos respectivos de n°. 921.08 e n°. 985.19 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 Determinação dos Componentes voláteis utilizando CG-EM**

A análise da composição química do óleo essencial foi realizada usando um sistema de 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 os padrões registrados na base de dados de referência da biblioteca Wiley 229 e entre os tempos de retenção calculados com valores da literatura especializada.

## **2.5 Atividade antibacteriana**

### **2.5.1 Estirpes bacterianas**

Para os testes de atividade antibacteriana *in vitro* foram utilizadas as estirpes *Aeromonas hydrophila* INCQS 7966, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 11253, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, obtidos a partir da Coleção de Micro-organismos do Instituto Nacional de Controle de Qualidade (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, Brasil) e *Salmonella* Enteritidis CDC 49812.

Os inóculos utilizados no teste antimicrobiano foram obtidos a partir de culturas cultivadas por overnight em ágar Müeller Hinton (HiMedia<sup>®</sup>, Mumbai, Índia) inclinado, a 28 °C para *A. hydrophila* e *P. fluorescens* e, 37 °C para os demais micro-organismos. Foram preparados inóculos em solução salina estéril (0,85 g 100 mL<sup>-1</sup>) com uma concentração final de aproximadamente 10<sup>8</sup> unidade formadora de colônia por mL (ufc.mL<sup>-1</sup>) ajustado de acordo com a turbidez padrão da escala 0,5 McFarland.

### **2.5.2 Teste de difusão em disco**

A atividade antibacteriana foi testada pelo método de difusão em disco de acordo com a metodologia modificada do CLSI (2003), utilizando-se 100 µL de suspensão dos micro-organismos testados, contendo bactérias cerca de 10<sup>8</sup> ufc.mL<sup>-1</sup> para inocular as placas. Discos de papel filtro (6 mm de diâmetro) foram impregnados com 20 µl do óleo essencial, que foram

secos, e colocados em placas inoculadas com as estirpes bacterianas, incubadas a 37 °C em aerobiose por 24 h. Após o período de incubação, o diâmetro das zonas de inibição foi medido com paquímetro e expresso em milímetros. Foi considerado como atividade antibacteriana positiva quando observadas zonas de inibição de crescimento com diâmetro igual ou superior a 10 mm de diâmetro. Os testes foram realizados em triplicata, e os antibióticos penicilina (10 µg/mL) e neomicina (10 µg/mL) foram utilizados como referência para as bactérias.

### **2.5.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)**

Os valores da CIM e CBM do óleo essencial foram determinados através do procedimento de macrodiluição em caldo. 5 mL da concentração dobrada de caldo Müeller Hinton (HiMedia®, Mumbai, Índia) foi inoculado com 1 mL dos inóculos de bactérias, 4 mL da solução de óleo essencial com a concentração adequada foi adicionado, e agitados por 30 s. O sistema foi incubado por 24 horas a 37 °C. A CIM foi definida como a menor concentração do óleo essencial que inibiu completamente o crescimento bacteriano visível. Uma alíquota (100 µL) dos tubos sem crescimento visível de bactérias foi subcultivada a 37 °C por 48 horas em placas de Petri contendo ágar Müeller Hinton estéril para determinar se a inibição foi reversível ou permanente. A CBM foi definida como a menor concentração em que não houve crescimento em ágar Müeller Hinton. Amostras controle sem óleo essencial foram testados utilizando o mesmo procedimento (Fu et al., 2007).

## **3 Resultados e Discussão**

O óleo essencial apresentou como parâmetros físico-químicos uma coloração amarelo pálido, aparência límpida, odor característico, valores respectivos de 1,4866 e 0,8660 g mL<sup>-1</sup> para o índice de refração e a densidade. No que se refere à solubilidade em etanol 90 %, o resultado demonstrou que o óleo essencial foi solúvel na proporção 1:1.

O rendimento da extração obtido das folhas do *C. blanchetiaius* foi de 0,7% v/v, corroborando com os resultados encontrados por Angélico et al. (2011) em que relatou rendimento de 0,72 % em óleo essencial da planta estudada. Conforme relatado por Baydar et al. (2004), o rendimento do óleo essencial de diferentes variedades de plantas é dependente da época, clima e condições geográficas.

A Tabela 1 apresenta a composição química do óleo essencial extraído de folhas de *C. blanchetianus* Baill juntamente com os tempos de retenção dos compostos. Um total de 14 compostos

foram identificados a partir dos óleos essenciais de *C. blanchetianus* Baill, o que representou 99,99 % de compostos identificados do óleo extraído. Os monoterpenos e sesquiterpenos foram representados pelos índices de 59,43 % e 40,56 %, respectivamente. Os componentes majoritários encontrados foram limoneno (25,70 %),  $\alpha$ -pineno (16,32 %) e biciclogermacreno (13,00 %). Essa composição química é compatível com dados da literatura para constituintes voláteis de espécies de *Croton* cuja predominância é caracteristicamente de monoterpenos e sesquiterpenos (Meccia et al., 2000).

Estudando os componentes químicos da espécie *C. blanchetianus* Baill, Santos et al. (2005) verificaram a presença de 1-felandreno (6,16%), biciclogermacreno (10,22%), (E)-cariofileno (6,90%), h-elemeno (4,96%), germacreno D (4,77%), e espatulenol (7,29%). Na mesma espécie, Pinho-da-Silva et al. (2010) observaram 16,29% do biciclogermacreno, 15,42% de b-felandreno e 13,82% b-cariofileno, semelhantes aos encontrados em nossos estudos.

Oliveira (2008) relatou que as várias espécies do gênero *Croton* nativas da Caatinga nordestina, entre elas: *C. zehntneri*, *C. argyrophylloides*, *C. nepetaefolius* e *C. blanchetianus*, possuem diferentes constituintes químicos. Acredita-se, que essas diferenças na composição química dos óleos essenciais está relacionada à fisiologia e ao estágio de desenvolvimento, as condições ambientais, como a salinidade do solo, a umidade e a temperatura (Sangwan et al., 2001).

O óleo essencial foi testado contra duas bactérias Gram-positivas (*L. monocytogenes*, *S. aureus*) e quatro Gram-negativas (*A. hydrophila*, *E. coli*, *P. fluorescens*, *S. Enteritidis*). Os resultados dos testes revelaram que o óleo essencial possui atividade antibacteriana moderada (Tabela 2), apresentando valores de CIM com variação de 1,25 - 40  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) contra três estirpes bacterianas (*L. monocytogenes*, *A. Hydrophila* e *S. Enteritidis*), o que provavelmente pode-se resultar da presença de mono e sesquiterpenos encontrados em óleos essenciais de *Croton*. Cakir et al. (2004) reportaram que mono ou sesquiterpenos oxigenados e hidrocarbonetos monoterpenos ou sesquiterpenos são os principais componentes de óleos essenciais que apresentam potencial atividade antibacteriana.

Os resultados do teste de disco difusão em ágar para a atividade antimicrobiana do óleo essencial (Tabela 2), indicam que o óleo essencial apresentou um grau variável de atividade antimicrobiana contra as seis estirpes testadas, com zonas de inibição variando de 10 – 12 mm para *A. hydrophila* e *S. Enteritidis*, no entanto, o óleo essencial não apresentou atividade inibitória contra as Gram-negativas *Pseudomonas fluorescens* e *E. coli*. Verifica-se que *Pseudomonas* são conhecidas por apresentar um alto nível de resistência à maioria dos óleos essenciais e muitos antimicrobianos e antibióticos, devido sua capacidade multiresistente à drogas sintéticas (Bezic et al., 2003). A variação na atividade antibacteriana do óleo essencial, que ocorre de acordo com a sua

concentração e o tipo de bactéria testada, pode ser atribuída à alteração da taxa de penetração dos compostos presentes no óleo essencial através da parede celular e estrutura da membrana celular dos micro-organismos (Cox et al, 2001).

#### **4 Conclusão**

Em conclusão, os constituintes voláteis do óleo essencial de *C. blanchetianus* Baill apresentam predominância de monoterpenos e sesquiterpenos. Foram evidenciadas a atividade antimicrobiana do óleo frente *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila* e *Salmonella* Enteritidis. Sugere-se a necessidade de pesquisas para estabelecer seu potencial uso como antimicrobiano natural na indústria de alimentos, com a finalidade de obter informações sobre a prática efetiva do óleo essencial para prevenir o crescimento de micro-organismos em alimentos, bem como condições específicas de aplicação.

#### **Agradecimentos**

Os autores agradecem à José Galberto Martins da Costa (LPPN/URCA) pela realização da análise de CG/EM e à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo auxílio financeiro.

## Referências

- Amaral, J. F. *Atividade antiinflamatória, antinociceptiva e gastroprotetora do óleo essencial de Croton sonderianus Muell. Arg.* Fortaleza. (2004). Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará.
- Angélico, E. C.; Costa, J. G. M.; Rodrigues, O. G.; Lima, E. Q. de, & Medeiros, R. S. (2011). Composição química do óleo essencial das folhas de *Croton blanchetianus* Baill: Resultados Preliminares. *Biofar*, 5(2), 44-49.
- A.O.A.C. Association of Official Analytical Chemists. (2000). *Official methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 15 ed., Arlington, 1260p.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446–475.
- Baydar, H., Sagdic, O., Ozkan, G., & Karadogan, T. (2004). Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food Control*, 15, 169–172.
- Bezic, N., Skocibusic, M., Dinkic, V., & Radonic, A. (2003). Composition and antimicrobial activity of *Achillea clavennae* L. essential oil. *Phytotherapy Research*, 17, 1037–1040.
- Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods – A review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223–253.
- Cakir, A., Kordali, S., Zengin, H., Izumi, S., & Hirata, T. (2004). Composition and antifungal activity of essential oils isolated from *Hypericum hyssopifolium* and *Hypericum heterophyllum*. *Flavour and Fragrance Journal*, 19, 62–68.
- Carneiro-Torres, D. S., Cordeiro, I., Giulietti, A. M., Berry, P. E., & Riina, R. (2011). Three new species of *Croton* (Euphorbiaceae s.s.) from the Brazilian Caatinga. *Brittonia*, 63(1), 122–132.
- Caruzo, M. B. R., Riina, R., Cordeiro, I., & Berry, P. E. (2008). *Croton campanulatus* (Euphorbiaceae s.s.), a new species from the Brazilian Atlantic rain forest. *Brittonia*, 60, 261–264.
- Chaves, S. A. M., & Reinhard, K. J. (2003). Palespharmacology and Pollen: Theory, Method, and Application. *Memoirs Institute de Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro 98, 207–11.
- CLSI. (Clinical and Laboratory Standards Institute). *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard – 8ª Ed.* NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.
- Cox, S. D., Mann, C. M., Markham, J. L., Bell, H. C., Gustafson, J. E., Warmington, J. R., & Wyllie, S. G. (2000). Mode of antimicrobial action of essential oil of *Melaleuca alternifolia* tea tree oil. *Journal of applied microbiology*, 88(1), 170–175.
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564-582.
- 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, 36-40.
- Farmacopéia Brasileira*. 4 ed. Atheneu – São Paulo. 1999. 1213p.

- Fu, Y.J., Zu, Y.G., Chen, L.Y., Shi, X.G., Wang, Z., Sum, S., & Efferth, T. (2007). Antimicrobial activity of clove and rosemary essential alone and in combination. *Phytotherapy Research*, 21(10), 989-994.
- Govaerts, R., Frodin, D.G., & Radcliffe-Smith, A. (2000). *World checklist and bibliography of Euphorbiaceae*. (4 vols). Kew: Royal Botanic Gardens.
- McChesney, J. D., Clark, A. M., & Silveira, E. R. (1991). Antimicrobial diterpenes of *Croton sonderianus*, L, Hardwickic and 3,4- Secotrachylobanoic acids. *Journal of Natural Products*, 54(6), 1625–1633.
- Meccia, G., Rojas, L. B., Rosquete, C., & San Feleciano, A. (2000). Essential oil of *Croton ovalifolius* Vahl from Venezuela. *Flavour and Fragrance Journal*, 15, 144-146.
- Oliveira, A. P. R. *Efeito do Óleo Essencial do Croton sonderianus Muell.Arg. sobre o Trato Gastrointestinal*. 2008. 135p. Dissertação (Mestrado em Ciências fisiológicas) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.
- Pinho-da-Silva, L., Mendes-Maia, P. V., Nascimento Garcia, T. M. do, Cruz, J. S., Morais, S. M. de, Coelho-de-Souza, A. N., Lahlou, S., & Leal-Cardoso, J.H. (2010). *Croton sonderianus* essential oil samples distinctly affect rat airway smooth muscle. *Phytomedicine*, 17(10), 721-725.
- Sangwan, N. S., Farooqi, A. H. A., Shabih, F., & Sangwan, R. S. (2001). Regulation of essential oil production in plant. *Plant. Growth Regulation*, 34, 3-21.
- Santos, A. S., Andrade, E. H. A., Zoghbi, M. G. B., Luz, A. I. R., & Maia, J. G. S. (1998). Sesquiterpenes on Amazonian Piper Species. *Acta Amazonica*, 28(2), 127-130.
- 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.

**Tabela 1** Composição química do óleo essencial de *C. blanchetianus* Baill

No.	Tempo de retenção (min)	Composto	Teor (% <sup>a</sup> )
<b>1</b>	<b>5,15</b>	<b><math>\alpha</math>-pineno</b>	<b>16,32</b>
2	5,58	sabineno	2,33
3	5,64	$\beta$ -pineno	2,13
4	5,77	$\beta$ -mirceno	1,65
5	5,94	1-felandreno	5,97
<b>6</b>	<b>6,21</b>	<b>limoneno</b>	<b>25,70</b>
7	6,81	$\alpha$ -terpinoleno	5,33
8	8,94	bicicloelemeno	6,13
9	9,32	$\beta$ -elemeno	2,87
10	9,57	trans-cariofileno	6,05
11	9,99	germacreno D	2,80
<b>12</b>	<b>10,10</b>	<b>bicyclogermacreno</b>	<b>13,00</b>
13	10,65	spathulenol	8,05
14	10,74	viridiflorol	1,66
TOTAL			99,99 %

Os compostos majoritários estão indicados em negrito.

<sup>a</sup>Proporções relativas em porcentagem da área total do pico.

**Tabela 2** Atividade antimicrobiana do óleo essencial e antibiótico padrão frente a micro-organismos ATCC

Micro-organismos	Identificação	Zona de inibição (mm)				CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)
		OE	PE	NI	CO		
Gram positivo							
<i>L. monocytogenes</i>	ATCC 7644	nd	14	30	nd	1,25	2,5
<i>S. aureus</i>	ATCC 6538	nd	22	31	nd	nd	nd
Gram negativo							
<i>A. hydrophila</i>	INCQS 7966	12	24	32	nd	20	40
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	nd	nd	36	nd	nd	nd
<i>P. fluorescens</i>	ATCC 11253	nd	nd	27	nd	nd	nd
<i>S. Enteritidis</i>	CDC 49812	10	12	25	nd	40	80

OE: óleo essencial

PE: penicilina 10 µl/disco

NI: neomicina 10 µl/disco

CO: controle

CIM: concentração inibitória mínima, CBM: concentração bactericida mínima;

nd: não detectado

4.2 ARTIGO 2 - Sensibilidade de bactérias patogênicas de importância em alimentos ao óleo essencial de *Croton Blanchetianus* Baill

Submetido à revista:

**Brazilian Journal of Microbiology**

**Sensitivity of pathogen foodborne bacterial to *Croton blanchetianus* Baill essential oil**

Geiseanny Fernandes do Amarante Melo <sup>a,\*</sup>, Ana Caroliny Vieira da Costa <sup>a</sup>, Felício Garino Junior <sup>c</sup>, Rosália Severo Medeiros<sup>c</sup>, Vicente Queiroga Neto <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Engenharia de Alimentos, Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba, 58059-900 João Pessoa, Paraíba, Brasil.

<sup>b</sup> Laboratório de Análise de Matérias Primas Agropecuária, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Campus Patos, Paraíba, Brasil.

<sup>c</sup> Laboratório de Microbiologia, Hospital Veterinário, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande, Campus Patos, Paraíba, Brasil.

**Resumo**

O objetivo do estudo foi avaliar a ação do óleo essencial de folhas de *C. blanchetianus* Baill, popularmente conhecido como Marmeleiro, na inibição do crescimento e sobrevivência de microrganismos de importância em alimentos, por meio de determinação do tempo de morte *in vitro*, bem como observar o comportamento da *Listeria monocytogenes* inoculada em modelo alimentar (carne cortada em cubos) armazenado em temperatura de refrigeração (7 °C) durante 4 dias. Os resultados mostraram um efeito bactericida para *Aeromonas hydrophila* e *Listeria monocytogenes* e bacteriostática para *Salmonella* Enteritidis. Observou-se um efeito bacteriostático em todas as concentrações do óleo essencial testadas em carne contaminada com *L. monocytogenes*. Estes resultados mostram o óleo essencial das folhas de *C. blanchetianus* Baill como potencial fonte alternativa de antimicrobiano natural a ser aplicado em sistemas de conservação de alimentos.

**Palavras-chave:** óleo essencial, *Croton blanchetianus* Baill, atividade antimicrobiana, bactérias de origem alimentar

## 1 Introdução

A conservação de alimentos é baseada na busca de alimentos com alta qualidade nutricional e estabilidade microbiana, sendo alcançada pelo controle do crescimento/sobrevivência de microorganismos deteriorantes e patógenos de origem alimentar (4, 5). Para que a segurança microbiana em alimentos seja obtida, tem-se utilizado vários procedimentos físicos e/ou químicos (10, 18). Atualmente, o uso de conservantes químicos em alimentos tem sido questionado, principalmente por consumidores que exigem alimentos mais naturais (22, 26). Mais de 1.340 plantas são conhecidas como fontes potenciais de compostos antimicrobianos, porém poucas delas têm sido cientificamente estudadas (31).

Este panorama tem impulsionado pesquisas sobre o possível desenvolvimento e uso de produtos vegetais com propriedades antimicrobianas (33, 37). O uso de compostos antimicrobianos naturais tem a vantagem de ser mais aceitável pelos consumidores, sendo considerados como alimentos “sem química” (35).

As propriedades antimicrobianas de óleos essenciais obtidos de uma variedade de plantas têm evidenciado, a partir destes metabólitos secundários, potencial uso como alternativa de antimicrobianos na conservação de alimentos (8, 27, 29).

Espécies do gênero *Croton* são frequentemente utilizadas na medicina popular (na forma de infusões, chás e emplastos) para aliviar dor (1), constipação intestinal, diarreia e outros problemas digestivos, diabetes, feridas, inflamação, febre e hipertensão (30). Estudos realizados com algumas espécies revelaram várias atividades farmacológicas deste gênero, como: antidiabético (2), anti-inflamatória, antiulcerogênica, analgésica e anti-hipertensiva (24), dentre outras. *C. blanchetianus* Baill (sinônimo *Croton sonderianus* Müll. Arg.) (12), conhecida como marmeleiro preto, é um arbusto difundido largamente no Nordeste do Brasil. As folhas e cascas são usadas na medicina popular para o tratamento de distúrbios gastrintestinais, reumatismo e cefaleia (9). Possui um alto teor de óleo essencial que pode variar de 0,5% para 1,5% no seu rendimento (9). Além disso, é uma planta rica em diterpenos, com atividades biológicas diversificadas, como antiinflamatória, gastroprotetora e antimicrobiana (19).

O presente estudo teve como objetivo avaliar a eficácia do óleo essencial de folhas do *C. blanchetianus* Baill para inibir o crescimento de bactérias patogênicas Gram positivas e Gram negativas e, analisar a eficácia antibacteriana do óleo essencial de *C. blanchetianus* Baill em um modelo de carne em cortada em cubos durante o armazenamento sob refrigeração.

## 2 Materiais e Métodos

### 2.1 Óleo essencial

O óleo essencial foi obtido de folhas frescas de *Croton blanchetianus* Baill da região Nordeste brasileira. A espécie foi identificada por comparação com espécimes de herbário e uma exsicata (nº1462) foi depositada no herbário da Universidade Federal de Campina Grande, Patos, Paraíba, Brasil. A extração foi realizada por hidrodestilação por 2 horas. Após a secagem com sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) para a retirada dos últimos vestígios de água, o óleo essencial foi armazenado em frascos de vidro escuro a 4 °C. O óleo essencial foi testado em concentração variando de 80-0,6  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Soluções de óleo essencial foram preparadas em caldo Müller Hinton (MH) (HiMedia<sup>®</sup>, Mumbai, Índia) utilizando ágar bacteriológico (0,15 g.100 g<sup>-1</sup>) como agente de estabilização (6, 17).

### 2.2 Estirpes bacterianas

Estirpes de *Aeromonas hydrophila* INCQS 7966, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e *Salmonella* Enteritidis CDC 49812 foram utilizadas como micro-organismos teste. Inóculos utilizados em ensaios antimicrobianos foram obtidos a partir de culturas overnight cultivadas em ágar MH inclinado a 28 °C para *A. hydrophila* e a 37 °C para as demais bactérias. Uma alíquota da cultura foi diluída em solução salina estéril (0,85 g.100 mL<sup>-1</sup>) para ter uma concentração final de aproximadamente 10<sup>8</sup> (UFC.mL<sup>-1</sup>) ajustado de acordo com a turbidez padrão da escala 0,5 McFarland.

### 2.3 Testes de viabilidade celular

Em nossos experimentos anteriores com o óleo essencial de *C. blanchetianus* Baill, 20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  foi encontrado como concentração inibitória mínima (CIM) frente a estirpe de *Aeromonas hydrophila*; 1,25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para *Listeria monocytogenes* e 40  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para *Salmonella* Enteritidis (dados não publicados). Ensaios de viabilidade celular foram realizados usando o método de contagem de células viáveis, nas concentrações de CIM/2, CIM e CIMx2. Para isso, 5 mL da concentração dobrada de caldo MH foi inoculado com 1 mL da suspensão bacteriana. Em seguida, 4 mL da solução de óleo essencial de *C. blanchetianus* Baill foi adicionado para obter a concentração final adequada, e o sistema foi

incubado a 37 °C em aerobiose. Nos intervalos de 0, 30, 60, 120, 240, 360, 480 e 600 minutos pós-incubação, uma alíquota de 1,0 mL da suspensão foi diluída ( $10^{-1} - 10^{-5}$ ) em água peptonada estéril ( $0,1 \text{ g.}100 \text{ mL}^{-1}$ ) e uniformemente semeada em placa de Petri contendo ágar MH pela técnica de spread plate. Após o período de incubação, foi realizada a contagem do número de células viáveis, a qual foi expressa em log de UFC.mL<sup>-1</sup>. Amostras controle, sem óleo essencial foram testadas da mesma forma (3).

## 2.4 Atividade antimicrobiana em modelo alimentar

Porções de carne bovina, livres de gordura aparente, foram cortados em cubos de 3 cm<sup>3</sup> e acondicionados em Erlenmeyer com tampas, em seguida esterilizados em autoclave (121 °C/15 minutos a 121 atm). Após a esterilização, as porções de carne foram inoculadas com uma suspensão microbiana de acordo com o seguinte procedimento: os pedaços de carne foram individualmente imersos em 50 mL do inóculo bacteriano ( $10^8 \text{ UFC.mL}^{-1}$  preparado em solução salina estéril  $0,85 \text{ g.}100\text{mL}^{-1}$ ) e agitados com bastão de vidro estéril por 1 minuto com a finalidade de garantir uma inoculação homogênea. Posteriormente, os pedaços de carne foram aleatoriamente divididos em quatro grupos e imersos durante 30 segundos (1:4 p/v) em diferentes soluções: (I) controle - imerso em água destilada estéril; (II) imerso em solução contendo a CIM ( $1,25 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) do óleo essencial; (III) imerso em solução contendo a CIM x 2 ( $2,5 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) do óleo essencial; (IV) imerso em solução contendo a CIM x 5 ( $6,25 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) do óleo essencial e (V) imerso em solução contendo a CIM x 10 ( $12,5 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) do óleo essencial. As porções de carne foram acondicionadas em placas de Petri estéreis, seladas e armazenadas sob refrigeração ( $7 \text{ } ^\circ\text{C} \pm 1 \text{ } ^\circ\text{C}$ ). Nos período de 0, 24, 48, 72 e 96 horas de armazenamento, as amostras de carne foram submetidas a contagem UFC de *Listeria monocytogenes*. Os resultados foram expressos em log de unidades formadoras de colônias por grama de carne (log UFC.g<sup>-1</sup> de carne) (23).

## 2.5 Análise estatística

Análise estatística foi realizada para determinar as diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Tukey no tempo de morte das bactérias. Para isso o *software* STATISTICA versão 7.0 (Statsoft Inc, USA) foi utilizado para a análise dos dados.

### 3 Resultados e Discussão

As Figuras 1, 2 e 3 mostram o efeito da CIM/2, CIM e CIMx2 do óleo essencial de *C. blanchetianus* Baill sobre a viabilidade de estirpes de bactérias de interesse em alimentos. A curva de morte ou 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. Ainda, pode-se inferir que é a estimativa de mortalidade de uma população microbiana quanto à eficácia de uma dada concentração de um composto antimicrobiano, evidenciando a rapidez de um efeito bactericida ou a duração de um efeito bacteriostático determinado pelo número de células viáveis em placa (7).

Para a execução deste teste foram escolhidas três estirpes bacterianas: *Aeromonas hydrophila*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* Enteritidis, tomando como critério de inclusão os resultados de inibição em testes antimicrobianos. Todas as curvas de crescimento obtidas mostraram diferenciada atividade entre os valores das CIM. Em todas as interações, os valores de CIM e CIMx2 apresentaram resultados com diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) quando comparados aos resultados da amostra controle.

Na Figura 1 verifica-se que a população microbiana encontrada ao final do último tempo analisado (10 horas) apresentou valores ao redor de  $10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup>, ou seja, redução de 3-4 ciclos logarítmicos do número de células viáveis quando relacionado ao inóculo inicial. Por sua vez, a amostra controle mostrou no tempo de 10h uma população microbiana entre  $10^9$  e  $10^{10}$  UFC.mL<sup>-1</sup>, ou seja, um aumento ao redor de 100 a 1000 vezes do valor do inóculo inicial. A eficácia da CIM em inibir o crescimento das estirpes bacterianas mostrou maior efetividade a partir do tempo de 8 horas de interação, CIM/2 a partir das 10 horas e CIM x 2 a partir das 6 horas. Considera-se 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 (16).

Na Figura 2 observa-se uma evidência da ação bacteriostática (diminuição da taxa de crescimento) do óleo essencial de *C. blanchetianus* Baill frente a estirpe bacteriana estudada. Este efeito bacteriostático ficou bem evidenciado durante todo o período de interação (10 horas). 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 (32).

Alguns patógenos veiculados por alimentos quando expostos à ação de compostos com propriedades antimicrobianas podem exibir inicialmente uma exponencial diminuição da sua capacidade de crescimento seguida por subsequente aumento de resistência antimicrobiana (28). No caso da ocorrência deste fenômeno, as células microbianas resistentes que não representavam, em um primeiro momento, o maior número na população microbiana inicial, posteriormente podem apresentar uma maior proporcionalidade dentro da população total (28).

A possibilidade da ocorrência deste fenômeno pode ser observada na Figura 2, onde nota-se uma exponencial diminuição da população microbiana até o tempo de 8 horas de interação, seguido por um menor efeito de redução em uma curva ascendente de crescimento até o tempo de 10 horas de interação.

Na Figura 3, o efeito bactericida,  $\geq 3 \log_{10}$  redução de células viáveis, ou seja,  $\geq 99,9\%$  taxa de morte, foi encontrado após 4 horas de exposição ao óleo em  $2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , e 6 horas em  $0,6$  e  $1,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de óleo essencial. Entretanto, a amostra controle demonstrou no tempo de 10h uma população microbiana entre  $10^8$  e  $10^9 \text{ UFC.mL}^{-1}$ , ou seja, um aumento ao redor de 10 a 100 vezes do valor do inóculo inicial. Até 10 horas de interação, o óleo a  $2,5$  e  $1,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$  reduziu a contagem de células a  $\geq 4 \log_{10}$ . Promovendo, portanto uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) na contagem de bactérias em comparação com a amostra controle.

Pode-se ainda observar na Figura 3, um efeito de prolongamento do tempo de duração da fase lag (fase estacionária) da curva de crescimento bacteriano que é tomada como um indicador do tempo de adaptação a um novo meio ao qual foi exposta. Desta forma, quanto mais prolongada for a fase lag, ocorre uma maior dificuldade do micro-organismo se adaptar ao novo meio, e assim, não estabelecer um crescimento exponencial (34).

Mesmo encontrando satisfatória eficácia antimicrobiana da CIM do óleo essencial de *C. blanchetianus* Baill principalmente contra a *L. monocytogenes*, quando aplicado em modelo alimentar, verificou-se que não houve a redução do inóculo inicial, como verificado nos testes *in vitro*, porém em todas as concentrações testadas houve um efeito bacteriostático, encontrando-se a inibição mais efetiva nas concentrações da CIM e CIMx10, que no término de 4 dias manteve o inóculo inicial em  $10^5 \text{ UFC.mL}^{-1}$ .

Vale ressaltar que, em geral, maiores concentrações de óleo essencial são necessárias para que seja alcançada uma eficácia antimicrobiana em alimentos similar àquela obtida em experimentos em meio laboratorial. Em estudos com modelos alimentares, são encontrados valores de concentrações duas vezes maiores em leite semidesnatado (15), dez vezes em salsicha suína (25), cinquenta vezes em refeição tipo sopa (36) e de vinte e cinco a cem vezes

em queijo (21). Em nossos resultados, verificamos que a inibição de crescimento da *Listeria monocytogenes* foi mais efetiva na concentração de dez vezes maior que no experimento *in vitro*.

Ainda não está bem estabelecido o mecanismo responsável pela menor efetividade antimicrobiana de óleos essenciais quando aplicados em alimentos. Sugere-se, que a grande variabilidade de nutrientes em alimentos comparada aos meios de cultura poderia fornecer condições para que a célula microbiana se recupere de forma mais rápida do dano celular (11). Relata-se, a possibilidade do óleo essencial dissolver-se na fase lipídica do alimento, tornando-se assim menos disponível para agir sobre os micro-organismos presentes na fase aquosa (20).

Em sistemas de modelos alimentares, tanto as propriedades intrínsecas do alimento, como determinantes extrínsecos podem influenciar na efetividade antimicrobiana de óleos essenciais. Conforme relatos de Gutierrez, Barry-Ryan e Bourke (13, 14) a influência de diferentes componentes químicos sobre a ação antimicrobiana de diversos óleos essenciais aplicados isoladamente ou combinados, foram mais eficientes contra bactérias patogênicas quando aplicados em meios com elevado teor de proteína e alta acidez, baixos teores de gorduras e carboidratos, e níveis moderados de açúcares simples. Portanto, o modelo alimentar cárneo utilizado no presente experimento teriam menores interferências na efetividade antimicrobiana do óleo essencial.

#### **4 Conclusão**

Conclui-se que embora o óleo essencial tenha apresentado sensibilidade às bactérias testadas na cinética de morte *in vitro*, quando aplicado ao modelo alimentar cárneo a inibição bacteriana foi reduzida, em concentrações maiores do óleo. Um desafio para a aplicação prática de óleos essenciais em alimentos é otimizado para desenvolver combinações do óleo essencial em baixas doses com outras técnicas de conservação e manter a segurança do produto e prazo de validade.

#### **Agradecimentos**

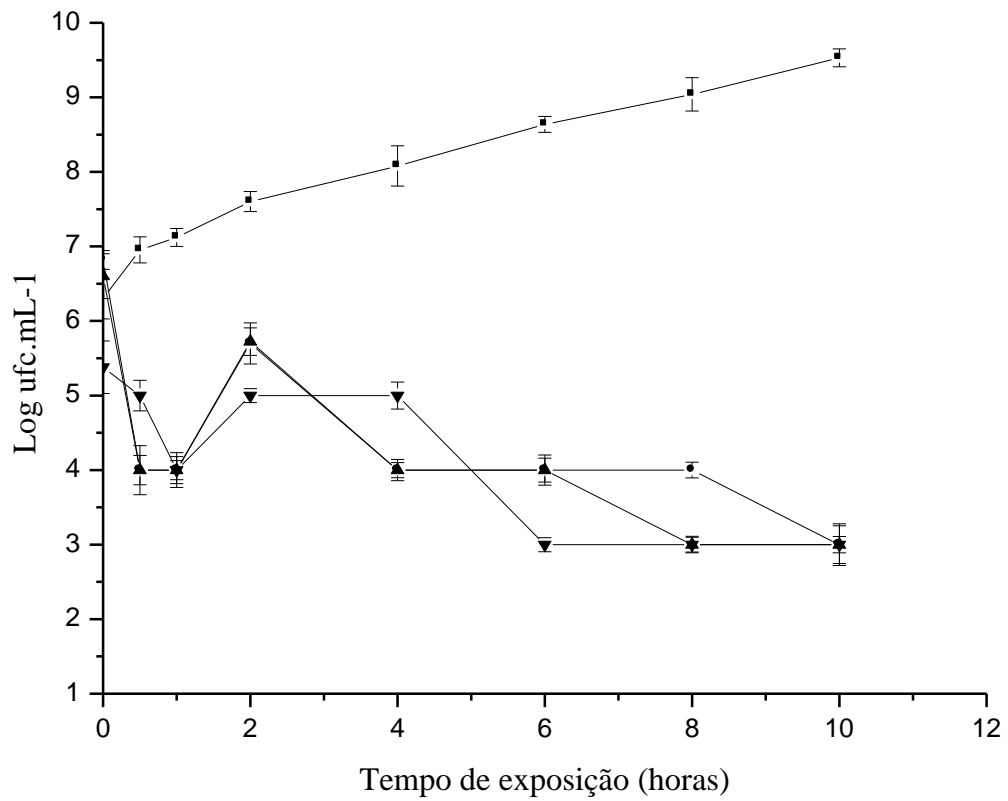
Agradecemos à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo auxílio financeiro.

## Referências

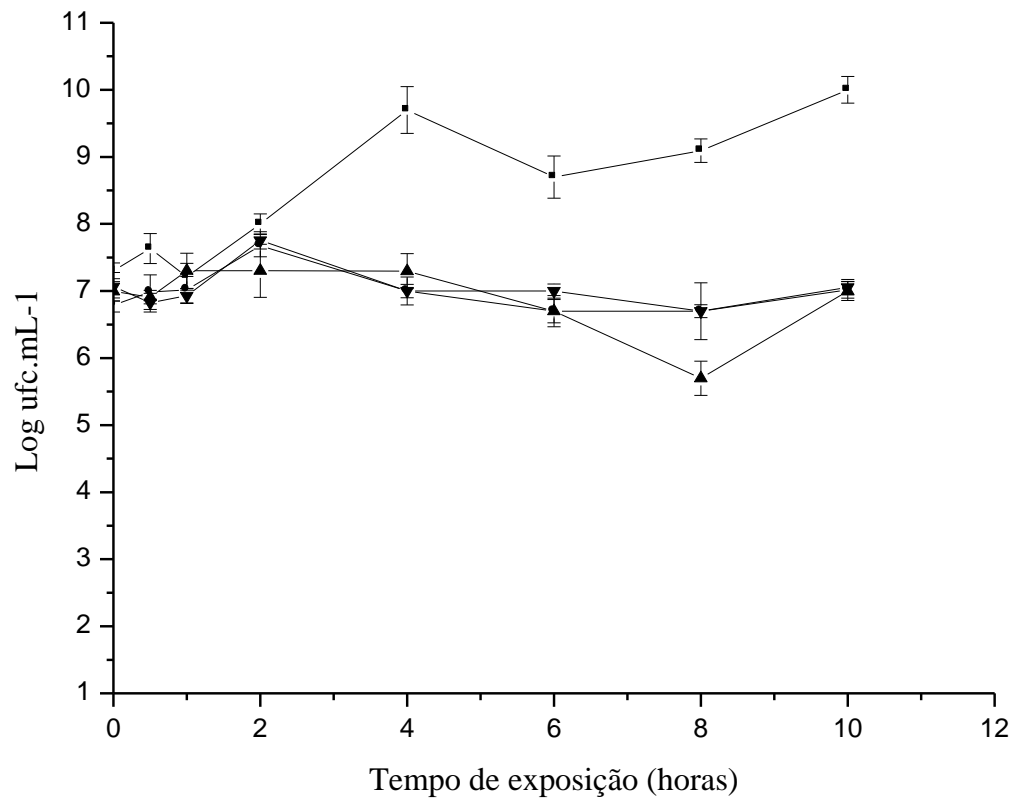
1. Abreu, A. S.; Barbosa, P. S.; Müller, A. H.; Guilhon, G. M. S. P. (2001). Constituintes químicos do caule e das cascas do caule de *Croton pullei* var *Glabrior* (Euphorbiaceae). *Revista Virtual de Iniciação Científica*. 1, 1-9.
2. Barbosa-Filho, J. M.; Vasconcelos, T. H. C.; Alencar, A. A.; Batista, L. M.; Oliveira, R. A. G.; Guedes, D. N.; Falcão, H. S.; Moura, M. D.; Diniz, M. F. F.; Modesto-Filho J. (2005). Plants and their active constituents from South, Central, and North America with hypoglycemic activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 15, 392-413.
3. Barros, J. C. de; Conceição, M. L. da; Gomes Neto, N. J. G.; Costa, A. C. V. da; Siqueira Júnior, J. P.; Basílio Junior, I. D.; Souza, E. L. de. (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, 1139–1143.
4. Baydar, H.; Sagdiç, O.; Ozkan, G.; Karadogan, T. (2004). Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food Control*. 15, 169-172.
5. Benkeblia, N. (2004). Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 37, 263-268,
6. Bennis, S.; Chami, F.; Chami, N., Bouchikhi, T.; Remma, A. (2004). Surface alteration of *Saccharomyces cerevisiae* induced by thymol and eugenol. *Letters in Applied Microbiology*. 38, 454–458.
7. Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in food – a review. *International Journal of Food Microbiology*. 94(3), 223-253.
8. Busatta, C.; Vidal, R. S.; Popiolski, A. S.; Mossi, A. J.; Dariva, C.; Rodrigues, M. R. A.; Corazza, F. C.; Corazza, M. L.; Vladimir Oliveira, J.; Cansian, R. L. (2008). Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. *Food Microbiology*. 25, 207-21.
9. Chaves, S. A. M.; Reinhard, K.J. (2003). Palespharmacology and Pollen: Theory, Method, and Application. *Memoirs Institute de Oswaldo Cruz*. 98, 207–11.
10. Daferera, D. J.; Ziogas, B. N.; Polissiou, M. G. (2003). The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop Protect*. 22, 39-44.
11. Gil, A. O.; Delaquis, P.; Russo, P.; Holley, R. A. (2002). Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. *International Journal of Food Microbiology*. 73(1), 83-89.
12. Govaerts, R.; Frodin, D.G.; Radcliffe-Smith, A. (2000). *World checklist and bibliography of Euphorbiaceae*. (4 vols). Kew: Royal Botanic Gardens.
13. Gutierrez, J.; Barry-Ryan, C.; Bourke, P. (2008). The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology*. 124, 91-97.
14. Gutierrez, J.; Barry-Ryan, C.; Bourke, P. (2009). Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: efficacy, synergistic potential and interactions with food components. *Food Microbiology*. 26, 142-150.

15. Karatzas, A. K.; Kets, E. P. W; Smid, E. J.; Bennik, M. H. J. (2001). The combined action of carvacrol and high hydrostatic pressure on *Listeria monocytogenes* Scott A. *Journal of Applied Microbiology*. 90(5), 463-369.
16. 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, 413-418.
17. Mann, C. M.; Markham, J. L. (1998). A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Applied Microbiology*. 84, 538–544.
18. Marino, M.; Bersani, C.; Comi, G. (2001). Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiaceae* and *Compositae*. *Int. J. Food Microbiol.* 67, 187-195,
19. McChesney, J. D.; Clark, A. M.; Silveira, E. R. (1991). Antimicrobial diterpenes of *Croton sonderiaus*, L, Hardwickic and 3,4- Secotrachylobanoic acids. *Journal of Natural Products*. 54 (6), 1625–1633.
20. Mejholm, O.; Dalgaard, P. (2002). Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organisms *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. *Letters in Applied Microbiology*. 34(1), 27-31.
21. Mendoza-Yepey, M. J.; Sanchez-Hidalgo, L. E.; Maertens, G., Marini-Iniesta, F. (1997). Inhibition of *Listeria monocytogenes* and other bacteria by plant essential oil (DMS) on Spanish soft cheese. *Journal of Food Safety*. 17(1), 47-55.
22. Nair, M. K. N.; Vasudevan, P.; Venkitanarayanan, K. (2005). Antibacterial effect of black seed oil on *Listeria monocytogenes*. *Food Control*. 16, 395-398.
23. Oliveira, C. E. V. de; Stamford, T. L. M.; Gomes Neto, N. J.; Souza, E. L. de. (2010). Inhibition of *Staphylococcus aureus* in broth and meat broth using synergies of phenolics and organic acids. *International Journal of Food Microbiology*, 137, 312–316.
24. Palmeira-Junior, S. F.; Alves, F. S. M.; Vieira, L. F. A.; Conversa, L. M.; Lemos, R. P. L. (2006). Constituintes químicos das folhas de *Croton sellowii* (Euphorbiaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 16, 397-402.
25. Pandit, V. A.; Shelef, L. A. (1994). Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Food Microbiology*. 11(1), 57-63, 1994.
26. Radhrakrishanan-Sridhar, S.; Velusamy-Rajagopal, R.; Ramasamy-Rajavel, R. (2003). Antifungal activity of some essential oils. *J. Agric. Food Chem.* 51, 7596-7599.
27. Rota, M. C.; Herrera, A.; Martínez, R. M.; Sotomayor, J. A.; Jordán, M. J. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. *Food Control*. 7, 681-687.
28. Rowan, N. J. (1999). Evidence that inimical food-preservation barriers alter microbial resistance, cell morphology and virulence. *Trends in Food Science and Technology*. 10(5), 251-270.
29. Sahin, F.; Gulluce, M.; Daferera, D.; Sokmen, A.; Polissiou, M.; Agar, G.; Ozer, H. (2004). Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control*. 15, 549-557.

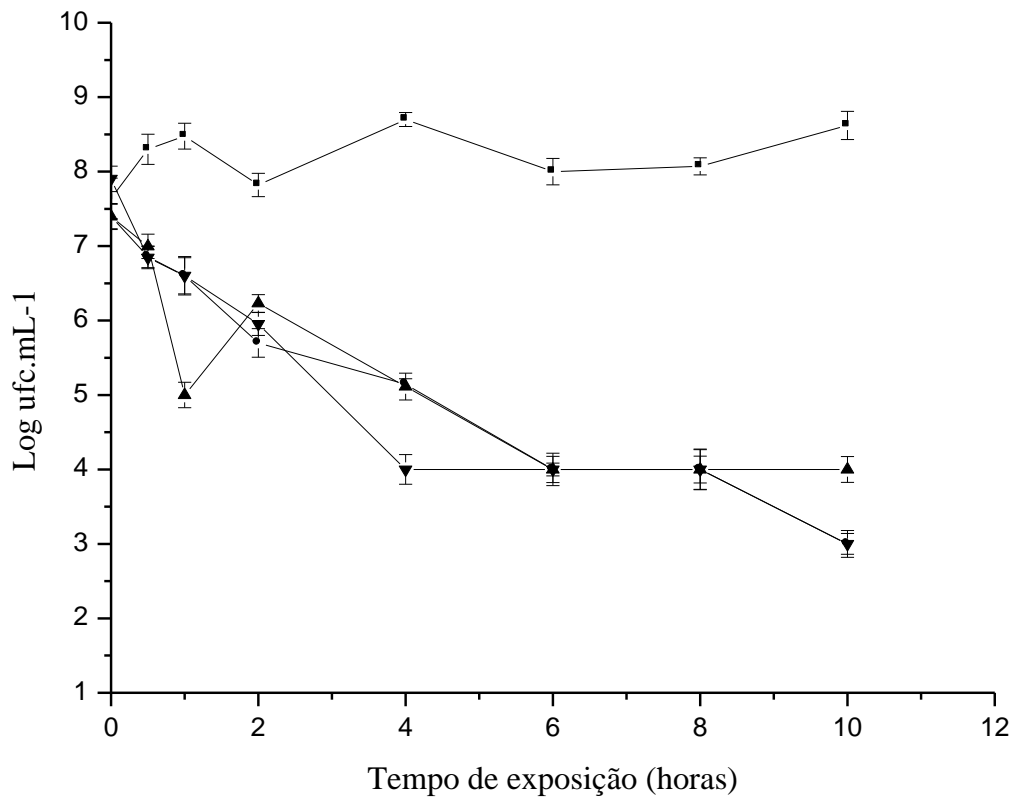
30. Salatino, A.; Salatino, M. L. F.; Negri, G. (2007). Traditional uses, Chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 18, 11-33.
31. Seidil, P. R. (2000). Pharmaceuticals from natural products. *An. Acad. Brasil. Cien.* 74, 145-1500.
32. 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, 118-122.
33. Souza, E. L.; Lima, E. O.; Freire, K. R. L.; Sousa, C. P. (2005). Inhibition action of some essential oils and phytochemicals on the growth of moulds isolated from foods. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 2, 245-250.
34. Trabulsi, L. R.; Alterthum, F.; Gompertz, O. F; Caneias, J. A. N. (2002) *Microbiologia*. (3ed). Rio de Janeiro: Atheneu.
35. Tzortzakis, N. G.; Economakis, C. D. (2007). Antifungal activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus* L.) essential oil against key postharvest pathogens. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 8, 253-258.
36. Ultee, A.; Smid, E. J. (2001). Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *Journal of Food Microbiology*. 64(3), 373-378.
37. Valero, M.; Salmerón, M. C. (2003). Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. *Int. J. Food Microbiol.* 85, 73-81.



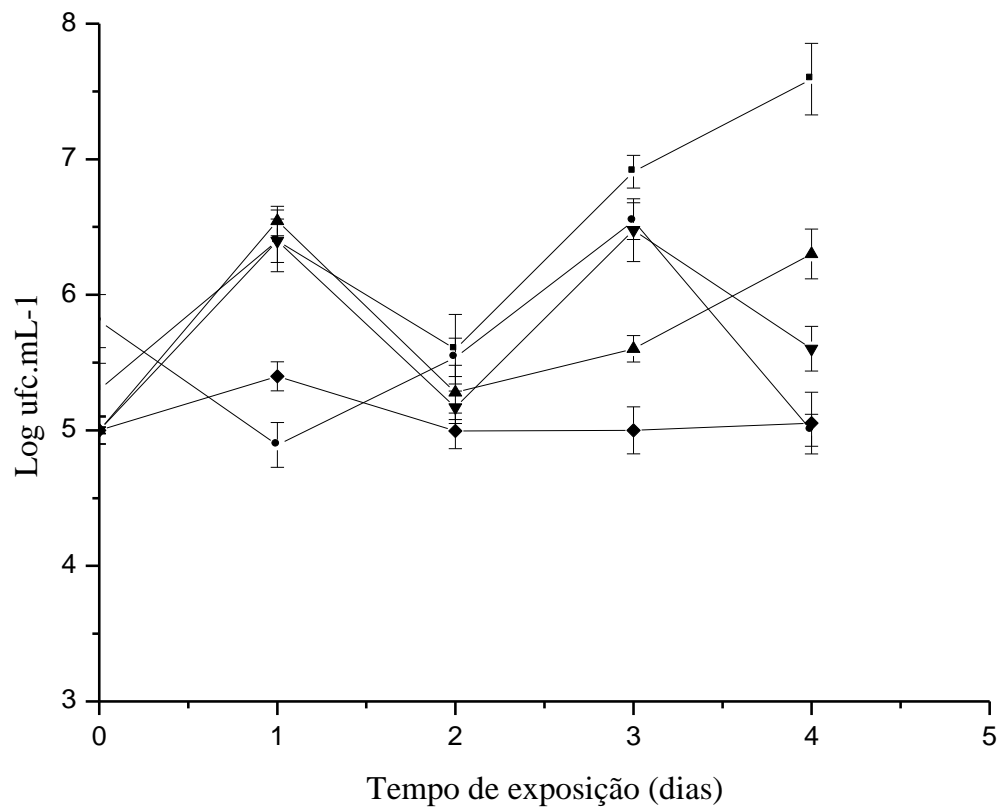
**Figura 1** Efeito do óleo essencial de *Croton blanchetianus* Baill sobre a viabilidade das células de *A. hydrophila*: ( ■ ) controle (0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ); ( ● ) CIM/2 (10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ); ( ▲ ) CIM (20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ); ( ▼ ) CIM x 2 (40  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) do óleo essencial.



**Figura 2** Efeito do óleo essencial de *Croton blanchetianus* Baill sobre a viabilidade das células de *Salmonella* Enteritidis: ( ■ ) controle ( $0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ); ( ● ) CIM/2 ( $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ); ( ▲ ) CIM ( $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ); ( ▼ ) CIM x 2 ( $80 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) do óleo essencial.



**Figura 3** Efeito do óleo essencial de *Croton blanchetianus* Baill sobre a viabilidade das células de *L. monocytogenes*: ( ■ ) controle ( $0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ); ( ● ) CIM/2 ( $0,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ); ( ▲ ) CIM ( $1,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ); ( ▼ ) CIM x 2 ( $2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) do óleo essencial.



**Figura 4** Efeito do óleo essencial de *Croton blanchetianus* Baill sobre a viabilidade das células de *L. monocytogenes* em pedaços de carne durante armazenamento em refrigeração por 5 dias: (■) controle (0 µg.g<sup>-1</sup>); (●) CIM (1,25 µg.g<sup>-1</sup>); (▲) CIM x 2 (2,5 µg.g<sup>-1</sup>); (▼) CIM x 5 (6,2 µg.g<sup>-1</sup>); (◆) CIM x 10 (12,5 µg.g<sup>-1</sup>) do óleo essencial.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados obtidos, no presente estudo, com o óleo essencial das folhas de *Croton blanchetianus* Baill nos permitem concluir:

- ❖ O rendimento do óleo essencial, obtido pelo processo de hidrodestilação foi prevista na espécie estudada, considerando os resultados citados por outros autores.
- ❖ A análise dos componentes voléteis apresentou predominância de monoterpenos e sesquiterpenos, sendo os componentes majoritários: limoneno,  $\alpha$ -pineno e biciclogermacreno, caracterizando a planta como aromática.
- ❖ Os valores da avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* óleo essencial demonstraram inibição contra três estirpes de micro-organismos: *L. monocytogenes*, *A. hydrophila* e *S. Enteritidis*.
- ❖ A cinética de morte *in vitro* mostrou um efeito bactericida para *Aeromonas hydrophila* e *Listeria monocytogenes* e bacteriostática para *Salmonella* Enteritidis.
- ❖ O comportamento da *Listeria monocytogenes* inoculada em modelo alimentar (carne cortada em cubos) apresentou um efeito bacteriostático em todas as concentrações do óleo essencial testadas.
- ❖ Estes resultados mostram que o óleo essencial de *C. Blanchetianus* Baill possui potencialidade como antimicrobiano natural. Para tanto, sugere-se novas pesquisas em alimento, bem como uso em conjunto com outras técnicas de conservação.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, A. S.; BARBOSA, P. S.; MÜLLER, A. H.; GUILHON, G. M. S. P. Constituintes químicos do caule e das cascas do caule de *Croton pullei* var *Glabor* (Euphorbiaceae). **Revista Virtual de Iniciação Acadêmica da UFPA**. v.1, n.2, p. 1-9. 2001.
- ABUSHELAIBI, A.; SOFOS, J. N.; SAMELIS, J.; KENDALL, P. A. Survival and growth of *Salmonella* in reconstituted infant cereal hydrated with water, milk or apple juice and stored at 4 °C, 15 °C and 25 °C. **Food Microbiology**. v. 20, n. 1, p. 17-25, 2003.
- AHMADI, F.; SADEGHI, S.; MODARRESI, M.; ABIRI, R.; MIKAELI A. Chemical composition, in vitro anti-microbial, antifungal and antioxidant activities of the **essential oil** and methanolic extract of *Hymenocrater longiflorus* Benth., of Iran. **Food and Chemical Toxicology**. v. 48, n. 5, p. 1137-1144, 2010.
- ALCARÃS, L. E.; SATORRES, S. E.; SEPULVEDA, L.; CENTORBI, O. N. P. Detección de *Staphylococcus aureus* spp. en manipuladores de alimentos. **La Alimentación Latino Americana**. v. 31, n. 219, p. 44-47, 1997.
- ALMEIDA, A. B. A.; MELO, P. S.; HIRUMA, C. A. L.; GRACIOSO, J. S.; CARLI, L.; NUNES, D. S.; HAUN, M.; BRITO, A. R. S. Antiulcerogenic effect and cytotoxic activity of semi-synthetic crotonin obtained from *Croton cajucara* Benth. **European Journal of Pharmacology**. v. 472, n. 3, p. 205-212, 2003.
- ALMEIDA, C. O. de. **Avaliação físico-química e microbiológica de lingüiça Toscana porcionada e armazenada em diferentes embalagens, sob condições de estocagem similares às praticadas em Supermercado**. 2005. 150p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.
- ALTMAN, P. M. Australian tea tree oil – a natural antiseptic. **Australian Journal Biotchnology**. v. 3, n. 4, p.247-248, 1989.
- AMÂNCIO, G. C. S.; PEREIRA, M. L.; CARVALHO, E. P. *Escherichia coli* enterohemorrágica (*E. coli* O157:H7). 1- Algumas considerações epidemiológicas sobre ecossistema, patogênese e controle. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 37, n. 2, p. 65-73, 2003.
- AMARAL, J. F. **Atividade antiinflamatória, antinociceptiva e gastroprotetora do óleo essencial de *Croton sonderianus* Muell. Arg.** 2004. 151p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2004.
- ANDRE, E.; FERREIRA, J.; MALHEIROS, A.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Evidence for the involvement of vanilloid receptor in the antinociception produced by the dialdehydes unsaturated sesquiterpenes polygodial and drimaniol in rats. **Neuropharmacology**. v. 46, n. 4, p. 590–597, 2004.

ANZAI, Y.; KIM, H.; PARK, J. Y.; WAKABAYASHI, H.; OYAIZU, H. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. **International Journal Systematic Evolutionary Microbiology**. v. 50, n. 4, p. 1563–1589, 2000.

AOCS. American Oil Chemists' Society. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. 4 ed. Champaign, USA, 1990. [A.O.C.S. Official method Cc 7-25].

ARAÚJO FILHO, J. A.; GADELHA, J. A.; LEITE, E. R.; SOUZA, P. Z.; CRISPIM, S. M. A.; REGO, M. C. Composição botânica e química da dieta de ovinos e caprinos em pastoreio combinado na região dos Inhamuns, Ceará. **Revista Sociedade Brasileira de Zootecnia**. v. 25, n. 3, p. 383-395, 1996.

ARAÚJO, E. C.; VIEIRA, M. E. Q.; CANTARELLI, R. F. **Valor nutritivo e consumo voluntário de forrageiras nativas da região semi-árida de Pernambuco. V - Marmeleiro (*Croton sonderianus* Muell. Arg)**. IN: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, p.263-265, 1996. Fortaleza. Anais... Fortaleza: SBZ, 1996.

ARIAS, T. D. Glosario de Medicamentos: desarrollo, evaluación y uso. Washington: **Organización Panamericana de La Salud**. Organización Mundial de La Salud, p. 171. 1999.

ARRUDA, T. A. **Estudo etnofarmacobotânico e atividade antimicrobiana de plantas medicinais**. 2002. 102p. Dissertação (Mestrado Interdisciplinar em Saúde Coletiva) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2001.

ARRUDA, T. A.; ANTUNES, R. M. P.; CATÃO, R. M. R.; LIMA, E. O.; SOUSA, D. P.; NUNES, X. P.; PEREIRA, M. S. V.; BARBOSA-FILHO, J. M.; CUNHA, E. V. L. Preliminary study of the antimicrobial activity of *Mentha x villosa* Hudson essential oil, rotundifolone and its analogues. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 16, n. 3, p. 307-311, 2006.

AVATO, P.; FORTUNATO, I.M.; RUTA, C.; D'ELIA, R. Glandular hair and essential oils in micropopagated plants of *Salvia officinalis* L. **Plant Science**. v. 169, n. 1, p. 29-36, 2005.

BAGAMBOULA, C. F.; UYTTENDAELE, M.; DEBEVERE, J. A. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and *p*-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. **Food Microbiology**. v. 21, p. 33-42, 2004.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**. v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.

BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal Enterotoxins (review). **International Journal of Food Microbiology**. v.61, n. 1, p. 1-10, 2000.

BANDONI, A. L.; CZEPACK, M. P. **Os recursos vegetais aromáticos no Brasil: seu aproveitamento industrial para a produção de aromas e sabores**. Vitória: EDUFES, 2008. 623 p.

BANNERMAN, T. L. & PEACOCK, S. J. *Staphylococcus, Micrococcus, and other catalase-positive cocci*. In: Manual of Clinical Microbiology. 9th ed., Washington, DC, ASM Press, p. 390-411, 2007.

BARBOSA-FILHO, J. M.; VASCONCELOS, T. H. C; ALENCAR, A. A.; BATISTA, L. M.; OLIVEIRA, R. A. G.; GUEDES, D. N.; FALCÃO, H. S.; MOURA, M. D.; DINIZ, M. F. F.; Modesto-Filho J. Plants and their active constituents from South, Central, and North America with hypoglycemic activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 15, n. 4, p. 392-413, 2005.

BARROS, J. C. de; CONCEIÇÃO, M. L. da; GOMES NETO, N. J. G.; COSTA, A. C. V. da; SIQUEIRA JÚNIOR, J. P.; BASÍLIO JUNIOR, I. D.; SOUZA, E. L. de. 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.

BAYDAR, H.; SAGDIÇ, O.; OZKAN, G.; KARADOGAN, T. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. **Food Control**. v. 15, n. 3, p. 169-172, 2004.

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**. 167p. 2001. Tese de Doutorado. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB.

BENKEBLIA, N. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**. v. 37, n. 9, p. 263-268, 2004.

BENKERROUM, N.; DAOUDI, A.; HAMRAOUI, T.; GHALFI, H.; THIRY, C. DUROY, M.; EYRART, P.; ROBLAIN, D. Lyophilized preparations of bacteriocinogenic *Lactobacillus curvatus* and *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* as potential protective adjuncts to control *Listeria monocytogenes* in dry-fermented sausages. **Journal of Applied Microbiology**. v. 98, n. 1, p. 56-63, 2005.

BERRY, P. **Croton Research Network**. Madison, University of Wisconsin Board of Regents, 2006. Disponível em: <<http://www.botany.wisc.edu/croton>> Acesso em: janeiro de 2010.

BERSOT, L. S.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B. D. G. M.; DESTRO, M. T. Production of mortadella: behavior of *Listeria monocytogenes* during processing and storage conditions. **Meat Science**. v. 57, n. 1, p. 13-17, 2001.

BHAVANANI, S. M.; BALLOW, C. H. New agents for Gram-positive bacteria. **Current Opinion Microbiology**. v. 3, n. 5, p.528-534, 2000.

BLANK, A. F.; FONTES, S. M.; CARVALHO FILHO, J. L. S.; ALVES, P. B.; SILVA-MANN, R.; MENDONÇA, M. C.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; RODRIGUES, M. O. Influência do horário de colheita e secagem de folhas no óleo essencial de melissa (*Melissa*

*officinalis* L.) cultivada em dois ambientes. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 8, n. 1, p. 73-78, 2005.

BOONCHILD, C.; FLEGEL, T. *In vitro* antifungal activity of eugenol and vanillin against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 28, n. 11, p.1235-1241, 1982.

BOZIN, B.; DUKIC, M. N.; SIMIN, N.; ANACKOV, G. Characterization of volatile composition of essential oils of some lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 54, n. 5, p. 1822-1828, 2006.

BRASIL, D. S. B., MULLER, A. H.; GUILHON, G. M. S. P.; ALVES, C. N.; ANDRADE, E. H. A.; SILVA, J. K. R.; MAIA, J. G. S. Essential oil composition of *Croton palanostigma* Klotzsch from north Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 20, n. 6, p. 1188-1192, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999 – 2004. **Boletim Eletrônico Epidemiológico**, Ano 5, nº 06, 28/12/2005.

BRAUN, P.; SUTHERLAND, J. P. Predictive modeling of growth and measurement of enzymatic synthesis and activity by a cocktail of selected Enterobacteriaceae and *Aeromonas hydrophila*. **International Journal of Food Microbiology**. v. 105, n. 2, p. 257-266, 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.

CAMPOS, A. R.; ALBUQUERQUE, F. A. A.; RAO, V. S. N.; MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C. Investigations on the antinociceptive activity of crude extracts from *Croton cajucara* leaves in mice. **Fitoterapia**. v. 73, n. 2, p.116-120, 2002.

CANILLAC, N.; MOUREY, A. Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. **Food Microbiology**. v. 18, n. 3, p.261-268, 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. 67 p.

CARNEIRO-LOUREIRO, A. C. **Efeito antiedematogênico e antinociceptivo do óleo essencial de *Croton sonderianus* Muell. Arg.** 2003. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Ceará, Fortaleza, 2003.

CASTRO, H. G. de; FERREIRA, F. A.; SILVA, D. J. H.; MOSQUIM, P. R. **Metabólitos secundários – contribuição ao estudo das plantas medicinais**. 2. ed. Visconde do Rio Branco: SUPREMA, 2004, 113p.

CENTER FOR DISEASE CONTROL (CDC). **Immunization of health-care workers. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) and the Hospital Infection Control Practices (HICPAC).** MMWR, v. 46, n. RR-18, p. 1-44, 1997.

CERQUEIRA, M. D. de; MARQUES, E. de J.; MARTINS, D.; ROQUE, N. F.; CRUZ, F. G. Variação Sazonal da composição do óleo essencial de *Myrcia salzmannii* Berg. (Myrtaceae). **Quimica Nova.** v. 32, n. 6, p. 1544-1548, 2009.

CHAVES, S. A. M.; REINHARD, K. J. Palespharmacology and pollen: theory, method, and application. **Memoirs Institute de Oswaldo Cruz.** v. 98, p. 207-11, 2003.

CHEN, L.; DANIEL, R. M.; COOLBEAR, T. Detection and impact of progease and lipase activities in milk and milkpowders. **International Dairy Journal.** v. 13, n. 4, p. 255-275, 2003.

CIMANGA, K.; KAMBU, K.; TONA, L.; APERS, S.; DE BRUYNE, T.; HERMANS, N.; TOTTE, J.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J. 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.** v. 79, n. 2, p.213-220, 2002.

CLAFFEY, N. Essential oil mouthwashes: a key component in oral health management. **Journal of Clinical Periodontology.** v. 30, n.(suppl.) 5, p.22- 24, 2003.

CLARK, N. M.; CHENOWETH, C. E. *Aeromonas* infection of the hepatobiliary system: report of 15 cases and review of the literature. **Clinical Infectious Disease.** v. 37, n. 4, p. 506-513, 2003.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E.; **Evaluation of new antimicrobials *in vitro* and experimental animal infections.** In: Lorian, V. M. D. *Antibiotics in Laboratory Medicine*, Williams & Wilkins, 1991, p.739-788.

CORDEIRO, I.; CARNEIRO-TORRES, D. Euphorbiaceae. In: **Checklist das plantas do nordeste brasileiro: Angiospermas e Gymnospermas.** Brasília: Ministério de Ciência e Tecnologia, p.71-74, 2006.

COSTA, J. G. M.; RODRIGUES, F. F. G.; ANGÉLICO, E. C.; SILVA, M. R.; MOTA, M. L.; SANTOS, N. K. A.; CARDOSO, A. L. H.; LEMOS, T. L. G. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** v. 15, n. 4, p. 304-309, 2005.

D'AOUST, J. Y.; MAURER, J. *Salmonella* species. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R., eds. **Food microbiology: fundamentals and frontiers.** 3.ed. Washington: ASM Press, 2007. p.187-236.

DABÉS, A. C.; SANTOS, W. L. M.; PEREIRA, E. M. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de produtos cárneos frente a *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.** v. 53, n. 1, p. 136-140, 2001.

- 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, n.1, 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.; PISTORELLO, I. T. M.; ARTICO, L.; SERAFINI, L. A.; ECHEVERRIGARAY, S. Antibacterial activity of essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. **Food Chemistry**. v. 100, n. 2, 2007.
- DEVIENNE, K. F.; RADDI, M. S. G. Screening for antimicrobial activity of natural products using microplate photometer. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 33, n. 2, p. 166-168, 2002.
- DEVLIEGHIERE, F.; VERMEIREN, L.; DEBEVERE, J. New preservation technologies: possibilities and limitations. **International Dairy Products**. v. 14, n. 4, p. 273-285, 2004.
- DÍAZ, T. M. L.; GONZÁLEZ, B.; MORENO, B.; OTERO, A. Effect of temperature water activity, pH and some antimicrobials on the growth of *Penicillium oslonii* isolated from the surface of Spanish fermented meat sausage. **Food Microbiology**. v. 19, n. 1, p. 1-7, 2002.
- 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.
- DOMÍNGUEZ, A.; TORNER, N.; RUIZ, L.; MARTINEZ, A.; BARTOLOME, R.; SULLEIRO, E.; TEIXIDO, A.; PLASENCIA, A. Foodborne *Salmonella*-caused outbreaks in Catalonia (Spain), 1990 to 2003. **Journal of Food Protection**. v. 70, n. 1, p.209-213, 2007.
- DONNELLY, C. W. *Listeria monocytogenes*: a continuing challenge. **Nutrition Reviews**. v. 59, n. 6, p. 183-194, 2001.
- DOURADO, R. C. M. **Contribuição ao conhecimento químico de plantas do Nordeste do Brasil: Terpenóides de *Croton sonderianus* – Euphorbiaceae**. 2003. Doutorado (Tese em Química orgânica e inorgânica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2003.
- DOYLE, M. P., CLIVER, D. O. *Salmonella*. In: D. O. CLIVER, ed., **Foodborne Diseases**. London: Academic Press, 1990, p. 185-204.
- 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.
- DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; PEREIRA, B.; MAGALHÃES, P. M.; DELARMINA, C. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 14, n. 1, p. 06-08, 2004.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L. G.; DELARMELINA, C. Anti-candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 97, n. 2, p.305-311, 2005.

DUSSURGET, O., PIZARRO-CERDA, J., COSSART, P. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. **Annual Review of Microbiology**. v. 58, n. 1, p. 587-610, 2004.

DYKES, G. A. Influence of the adaptation of *Listeria monocytogenes* populations to structured or homogeneous habitats on subsequent growth on chilled processed meat. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 85, n. 3, p. 301-306, 2003.

EPA. ENVIROMENTAL PROTECTION AGENCY. **Aeromonas: Human Health Criteria Document**. Washington, 2006.

ESSAWI, T; SROUR, M. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.70, n.3, p.343-349, 2000.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2005.

**FARMACOPÉIA BRASILEIRA**. 4 ed. Atheneu – São Paulo. 1999. 1213p.

FOLEY, S. L.; LYNNE, A. M. Food animal-associated *Salmonella* challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance. **Journal of Animal Science**. v. 86, n. 14 suppl, p. E173-E187, 2008.

FONTENELLE, R. O. S., MORAIS, S. M.; BRITO, E. H. S.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; NASCIMENTO, N. R. F.; KERNTOPF, M. R.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Antifungal activity of essential oils of *Croton* species from the Brazilian Caatinga biome. **Journal of Applied Microbiology**. v. 104, n. 5, p. 1383-1390, 2008.

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

FRANCO, B. D. G. M; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo, Atheneu, 2008. 182p.

FRANCO, M. R. B. **Aroma e sabor de alimentos: temas atuais**. São Paulo, Livraria Varela, 2003. 246 p.

FROMTLING, R. A.; PUI-YU, H.; SHADOMY, S. *In vitro* inhibitory activities of 2 new orally absorbable imidazole, derivatives: BAYN 7133 and BAYI 913. **Sabouraudia**, v. 21, n. 4, p. 179-184, 1983.

FU, Y. J.; ZU, Y. G.; CHEN, L. Y.; SHI, X. G.; WANG, Z.; SUM, S.; EFFERTH, T. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential alone and in combination. **Phytotherapy Research**. v. 21, n. 10, p. 989-994. 2007.

GAHAN, C. G. M.; HILL, C. Gastrointestinal phase of *Listeria monocytogenes* fection. **Journal of Applied Microbiology**. v. 98, n. 6, p. 1345-1353, 2005.

GALANIS, E.; LO FO WONG, D. M.; PATRICK, M. E.; BINSZTEIN, N.; CIESLIK, A.; CHALERMCHIKIT, T.; AIDARA-KANE, A.; ELLIS, A.; ANGULO, F. J.; WEGENER, H. C. Web-based surveillance and global *Salmonella* distribution, 2000-2002. **Emerging Infectious Diseases**. v. 12, n. 3, p. 381-388, 2006.

GARRITY, G. M. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2 ed., 1984.

GEIMBA, M. P.; TONDO, E. C.; DE OLIVEIRA, F. A.; CANAL, C. W.; BRANDELLI, A. Serological characterization and prevalence of *spvR* genes in *Salmonella* isolated from foods involved in outbreaks in Brazil. **Journal of Food Protection**. v. 67, n. 6, p. 1229-1233, 2004.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. ed. Barueri: Manole, 2008. 986p.

GERNER-SMIDT, P.; WHICHARD, J. M. Foodborne disease trends and reports. **Foodborne Pathogens and Disease**. v. 4, n. 1, p. 1-4, 2007.

GILL, A. O.; DELAQUIS, P.; RUSSO, P.; HOLLEY, R. A. Evaluation of antilisterial action of cilantro oil vacuum packed ham. **Journal Food Microbiology**. v. 73, n. 1, p. 83-92, 2002.

GILLARDI, G. L. *Pseudomonas* and related genera. In: Ballows, A. (ed) – The Manual of Clinical Microbiology. 5th ed. Washington DC, **American Society for Microbiology**. p.429-441, 1991.

GILL, S. R.; FOUTS, D. E.; ARCHER, G. L.; MONGODIN, E. F.; DEBOY, R. T.; RAVEL, J.; PAULSEN, I. T.; KOLONAY, J. F.; BRINKAC, L.; BEANAN, M.; DODSON, R. J.; DAUGHERTY, S. C.; MADUPU, R.; ANGIUOLI, S. V.; DURKIN, A. S.; HAFT, D. H.; VAMATHEVAN, J.; KHOURI, H.; UTTERBACK, T.; LEE, C.; DIMITROV, G.; JIANG, L.; QIN, H.; WEIDMAN, J.; TRAN, K.; KANG, K.; HANCE, I. R.; NELSON, K. E.; FRASER, C. M. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. **Journal of Bacteriology**. v. 187, n. 7, p. 2426-2438, 2005.

GONI, P.; LOPEZ, P.; SANCHEZ, C.; GOMEZ-LUS, R.; BECERRIL, R.; NERIN, C. Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. **Food chemistry**. v. 116, n. 4, p. 982-989, 2009.

GONZALEZ, A. G.; FRAGA, B. M.; HERNANDEZ, M. G.; HANSON, J. R. The <sup>13</sup>C NMR spectra of some ent-18-hydroxykaur-16-enes. **Phytochemistry**. v.20, n. 4, p.846-847, 1981.

GOINGUENÉ, S. P.; TURLINGS, T. C. J. The effects of abiotic factors on induced volatile emissions in corn plants. **Plant Physiology**. v. 129, n. 3, p. 1296-1307, 2002.

GOVAERTS, R., FRODIN, D. G.; RADCLIFFE-SMITH, A. **World Checklist and Bibliography of Euphorbiaceae (and Pandaceae)**. 4 vols. Kew: Royal Botanic Gardens. 2000. 1622p.

GREIG, J. D.; RAVEL, A. Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution. **International Journal of Food Microbiology**. v. 130, n. 2, p. 77-87, 2009.

GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F. **Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars**. 9.ed. Paris: Institut Pasteur, WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, 2007. 166p. Disponível em: [http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadrecnr/salmoms/WKLM\\_2007.pdf](http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadrecnr/salmoms/WKLM_2007.pdf). Acesso em: 05 novembro de 2009.

GUDBJÖRNSDÓTTIR, B.; SUIHKO, M. L.; GUSTAVSSON, P.; THORKESSON, G.; SALO, S.; SJÖBERG, A. M.; NICLASEN, O.; BREDHOLT, S. The incidence of *Listeria monocytogenes* in meat, poultry and seafood plants in the nordic countries. **Food Microbiology**. v. 21, n. 2, p. 217-225, 2004.

GUERRERO, M. F.; PUEBLA, P.; CARRON, R.; MARTIN, M. L.; ROMAN, L. S. Quercetin 3,7-dimethyl ether: a vasorelaxant flavonoid isolated from *Croton schiedeanus* Schlecht. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 54, n. 10, p. 1373-1378, 2002.

GURGEL, L. A.; SILVA, R. M.; SANTOS, F. A.; MARTINS, D. T.; MATTOS, P. O.; RAO, V. S. Studies on the antidiarrhoeal effect of dragon's blood from *Croton urucurana*. **Phytotherapy Research**. v. 15, n. 4, p. 319-322, 2001.

GUTIERREZ, G.; ABEE, T.; BOOTH, I. R. Physiology of osmotic stress response in microorganisms. **International Journal of Food Microbiology**. v. 28, n. 2, p. 233-244, 1995.

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

HALCON, L.; MILKUS, K. *Staphylococcus aureus* and wounds: a review of tea tree oil as a promising antimicrobial. **American Journal of Infection Control**. v. 32, n. 7, p. 402-408, 2004.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**. v. 86, n. 6, p. 985-990, 1999.

HARF-MONTEIL, C.; FLÈCHE, A. L.; RIEGEL, P.; PRÉSVOT, G.; BERMOND, D.; GRIMONT, P. A.; MONTEIL, H. *Aeromonas simiae* sp. nov., isolated from monkey faeces. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 54, n. 2, p. 481-485, 2004.

HELMS, M.; SIMONSEN, J.; MOLBAK, K. Foodborne bacterial infection and hospitalization: a registry-based study. **Clinical Infectious Diseases**. v. 42, n. 4, p. 498-506, 2006.

HELUANI, C. S.; CATALAN, C. A. N.; HERNÁNDEZ, L. R.; TAPIA, E. B.; NATAN, P. T. Three new diterpenoids based on novel sarcopetalene skeleton from *Croton sarcopetalus*. **Journal Natural Products**. v. 63, p. 222-225. 2000.

HERNANDEZ, E. **Essential oils: Distillation**. Texas A&M University, p. 2739 – 2744. 2000.

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

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SMITH, P. H. A.; STANLEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9th Ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1994.

HOOD, J. R.; WILKINSON, J. M.; CAVANAGH, H. M. A. Evaluation of common antibacterial screening methods utilized in essential oil research. **Journal of Essential Oil Research**. v. 15, n. 6, p. 428-433, 2003.

HSIEH, P. C., MAU, J. L., HUANG, S. H. Antimicrobial effect of various combinations of plant extracts. **Food Microbiology**. v. 18, n. 1, p. 35–43, 2001.

HUDDLESTON, J. R.; ZAC, J. C.; JETER, R. M. Antimicrobial susceptibilities of *Aeromonas* spp. Isolated from environmental sources. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 72, n. 11, p. 7036-7042, 2006.

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.

ISMAIEL, A. A., PIERSON, M. D. Effect of sodium nitrite and origanum oil on growth and toxin production of *Clostridium botulinum* in TYG broth and ground pork. **Journal of Food Protection**. v. 53, n. 11, p. 958–960. 1990.

ISONHOOD, J. H.; DRAKE, M. *Aeromonas* species in foods. **Journal of Food Protection**. v. 65, n. 3, p. 575-582, 2002.

IWATSUKI, K.; YAMASAKI, O.; MORIZANE, S.; OONO, T. Staphylococcal cutaneous infections: invasion, evasion and aggression. **Journal of Dermatological Science**. v. 42, n. 3, p. 203-214, 2006.

JALSENJAK, V.; PELJNJAK, S.; KUSTRAK, D. Microcapsules of sage oil: essential oils content and antimicrobial activity. **Pharmazie**. v. 42, n. 6, p. 419-420, 1987.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. **Clinical Infectious Disease**. v. 27, n. 2, p. 332-344, 1998.

JANSSEN, A. M.; SCHEFFER, J. J.; BAERHEIM, S. A. Antimicrobials activities of essential oils A 1976-1986 literature review on possible applications. **International Journal of Clinical Pharmacy**. v. 9, n. 4, p. 193-197, 1987.

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

JOSEPH, S. W.; CARNAHAN, A. M. Update on the Genus *Aeromonas*. **ASM News**. v. 66, n. 4, p. 218-223, 2000.

JUGLAL, S.; GOVINDEN, R.; ODHAV, B. Spices oils for the control of co-occurring mycotoxin-producing fungi. **Journal of Food Protection**. v. 65, n. 4, p. 638-687, 2002.

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.

KARATZAS, A. K.; KETS, E. P. W.; SMID, E. J.; BENNIK, M. H. J. The combined action of carvacrol and high hydrostatic pressure on *Listeria monocytogenes* Scott A. **Journal of Applied Microbiology**. v. 90, n. 3, p. 463-469, 2001.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia Básica & Clínica**. 8ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2003, 1054 p.

KERSTERS, I.; HUYS, G.; VAN, D. H.; VANCANNEYT, M.; KERSTERS, K.; VERSTRAETE, W. Survival potential of *Aeromonas hydrophila* in freshwaters and nutrient-poor waters in comparison with other bacteria. **Journal Applied Microbiology**. v. 80, n. 3, p. 266-76, 1996.

KIM, J.; MARSHALL, M. R.; WEI, C. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 43, n. 11, p. 2839-2845, 1995.

KIVES, J.; ORGAZ, B.; SANJOSE, C. Polysaccharide differences between planktonic and biofilm-associated EPS from *Pseudomonas fluorescens*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 52, n. 2, p. 123-127, 2006.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, W. C. **Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas colorido**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, 1760p.

KOUTOUSMANIS, K.; LAMBROUPOULOU, K.; NYCHAS, G. J. E. A predictive model for the non-thermal inactivation of *Salmonella enteritidis* in a food model system supplemented with a natural antimicrobial. **Journal of Food Microbiology**. v. 49, p. 63-74, 1999.

KRUGER, M. F. **Controle de *Listeria monocytogenes* em linguiça frescal refrigerada através do uso de óleo essencial de orégano e nisina**. 2006. 91p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

KUBOTA, K.; IWASAKI, E.; INAGAKI, S.; NOKUBO, T.; SAKURAI, Y.; KOMATSU, M.; TOYOFUKU, H.; KASUGA, F.; ANGULO, F. J.; MORIKAWA, K. The human health burden of foodborne infections caused by *Campylobacter*, *Salmonella*, and *Vibrio parahaemolyticus* in Miyagi Prefecture, Japan. **Foodborne Pathogens and Disease**. v. 5, n. 5, p. 641-648, 2008.

KUHNERT, P.; BOERLIN, P.; FREY, J. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolated from water, food and environment. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 24, n. 1, p. 107-117, 2000.

KUSTRAK, I.; PEPELJNJAK, S. Antimicrobial activity of Dalmatian sage oil from different regions of the Yugoslav Adriatic Coast. **Acta Pharmaceutica Jugoslavica**. v. 39, n. 3, p. 209-213, 1989.

LAI, C. C.; SHIAO, C. C.; LU, G. D.; DING, L. W. *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* bacteremia: rare pathogens of infection in a burn patient. **Burns**. v. 33, n. 2, p. 255-257, 2007.

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

LEAL-CARDOSO, J. H.; FONTELES, M. C. Pharmacological effects of essential oils of plants of the Northeast of Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 71, n. 2, 1999.

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.

LIMA, E. O. **Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica**. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. Chapecó: Agros, 2002, p. 482-501.

LIMA, E. O.; FARIAS, N. M. P. Atividade antifúngica de óleos essenciais obtidos de plantas medicinais contra leveduras do gênero *Candida*. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**. v. 3, n. 1/3, p. 51-64, 1999.

LIMA, E. O.; GOMPERTZ, O. F.; GIESBRECHT, A. M.; PAULO, M. Q. "In vitro" antifungal activity of essential oils obtained from officinal plants against dermatophytes. **Mycoses**. v. 36, n. 9/10, p. 333-336, 1993.

LIMA, I. O.; OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; FARIAS, N. M. P.; SOUZA, E. L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 16, n. 2, p. 197-201, 2006.

LIS-BALCHIN, M.; DEANS, S. G. Bioactivity of selected plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Microbiology**. v. 82, n. 6, p. 759-762, 1997.

LISERRE, A. M.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M. T.; FRANCO, B. D. G. M. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by a bacteriocinogenic *Lactobacillus sakei* Strain in modified atmosphere-packaged Brazilian sausage. **Meat Science**. v. 61, n. 4 p. 449-455, 2002.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas Cultivadas**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2002.

LUCINI, M. A.; FARIÑA, L. O. de; FALCONI, F. A.; DRUNKLER, D. A. Avaliação da qualidade tecnológica de envoltório natural suíno utilizado no processamento de lingüiça toscana. **Ciência e agrotecnologia**. v. 33, n. 3, p. 831-836, 2009.

LÜCK, E.; JAGER, M. **Conservación química de los alimentos: características, uso, efectos**. 2. ed., Zaragoza: Acribia, 2002.

MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., PARKER, J. **Biology of microorganisms**, 8th ed. Prentice-Hall International Inc., New Jersey. 1997.

MAIA, G. N. **Caatinga árvores e arbustos e suas utilidades**. 1ª Ed. Leitura & Arte. 2004. 19-31p.

MANO, S. B.; ORDOÑEZ, J. A.; FERNANDO, G. D. G. Growth/survival of natural flora and *Aeromonas hydrophila* on refrigerated uncooked pork and turkey packaged in modified atmospheres. **Food Microbiology**. v. 17, n. 6, p. 657-669, 2000.

MARCHAND, S.; COUDIJZER, K.; DEWTTINCK, 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.

MARINO, M.; BERSANI, C.; COMI, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. **International Journal of Food Microbiology**. v. 67, n. 3, p. 187-195, 2001.

MARTÍN, B.; JOFRÉ, A.; GARRIGA, M.; HUGAS, M.; AYMERICH, T. Quantification of *Listeria monocytogenes* in fermented sausages by MPN-PCR method. **Journal in Applied Microbiology**. v. 39, n. 3, p. 209-295, 2004.

MASSON, Y.; AINSWORTH, P.; FULLER, D.; BOZKURT, H.; IBANOGLU, S. Growth of *Pseudomonas fluorescens* and *Candida sake* in homogenized mushrooms under modified atmosphere. **Journal of Food Engineering**. v. 54, p. 262-270, 2004.

MATAN, N.; RIMKEEREE, H.; MAWSON, A. J.; CHOMPREEEDA, P.; HARUTHAITHANASAN, V.; PARKER, M. Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. **International Journal of Food Microbiology**. v. 107, n. 2, p. 180-185, 2006.

MATOS, J. M. D; MATOS, M. E. O. **Farmacognosia: curso teórico-prático**. Fortaleza: EDUFC, 1989.

MATTOS, F. J. A. **Plantas da medicina popular do Nordeste: propriedades atribuídas e confirmadas**. UFC, Fortaleza, 1999.

- MCCHESENEY, J. D.; CLARK, A. M.; SILVEIRA, E. R. Antimicrobial diterpenes of *Croton sonderianus* II. ent-Beyer-15-en-18-oic acid. **Pharmacology Research**. v. 8, p.1243-1247, 1991.
- MCCHESENEY, J. D.; CLARK, A. M.; SILVEIRA, E. R. Antimicrobial diterpenes of *Croton sonderianus*, 1. hardwickic and 3,4-secotrachylobanoic acids. **Journal of Natural Products**. v. 54, n. 6, p. 1625-1633, 1991.
- MEAD, P. S.; DUNNE, E. F.; GRAVES, L.; WIEDMANN, M.; PATRICK, M.; HUNTER, S.; SALEHI, E.; MOSTASHARI, F.; CRAIG, A.; MSHAR, P.; BANNERMAN, T.; SAUDERS, B. D.; HAYES, P.; DEWITT, W.; SPARLING, P.; GRIFFIN, P.; MORSE, D.; SLUTSKER, L.; SWAMINATHAN, B. Nationwide outbreak of listeriosis due to contaminated meat. **Epidemiology and Infection**. v. 134, n. 4, p. 744-751, 2006.
- MECHKOVSKI, A.; AKERELE, C. O. **Quality control methods for medicinal plant materials**. WHO/PHARM/92.559. World Health Organization, Switzerland, 1992.
- MENDONÇA, A. T. **Efeito dos óleos essenciais de condimentos sobre o crescimento de *Sphylococcus aureus* em ricota cremosa**. 2004. 72 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004
- 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.
- MOULIN, A. M. A hipótese vacinal: por uma abordagem crítica e antropológica de um fenômeno histórico. **História Ciências Saúde - Manguinhos**. v. 10, suppl. 2, p. 499-517, 2003.
- MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M.A. **Microbiologia médica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.
- MUCH, P.; PICHLER, J.; KASPER, S. S.; ALLERBERGER, F. Foodborne outbreaks, Austria 2007. **Wiener Klinische Wochenschrift**. v. 121, n. 3/4, p. 77-85, 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.
- NASCIMENTO FILHO, I. **Estudo de compostos orgânicos em lixiviado de aterro sanitário**. 2002. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.
- NASCIMENTO, P. F. C.; NASCIMENTO, A. C.; RODRIGUES, C. S.; ANTONIOLLI, Â. R.; SANTOS, P. O.; JÚNIOR, A. M. B.; TRINDADE, R. C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 17, n. 1, p. 108-113, 2007.
- NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 11, n. 1, p. 142, 1998.

NAZER, A. I., KOBILINSKY, A., THOLOZAN, J. L., DUBOIS-BRISSENET, F. Combinations of food antimicrobials at low levels to inhibit the growth of *Salmonella* sv Typhimurium: a synergistic effect. **Food Microbiology**. v. 22, n. 5, p. 391–398, 2005.

CLSI. (Clinical and Laboratory Standards Institute). **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard** – 8<sup>a</sup> Ed. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

NEYTS, K.; HUYS, G.; UYTTENDAELE, M.; SWINGS, J.; DEBEVERE, D. J. Incidence and identification of mesophilic *Aeromonas* spp. from retail foods. **Letters in Applied Microbiology**. v. 31, n. 5, p. 359-363, 2000.

NICKAVAR, B.; MOJAB, F.; ASGARPAHAH, J. Volatile composition of the essential oil of *Salvia hypoleuca* Benth. **The International Journal of Aromatherapy**. v. 15, n. 1, p. 51-53, 2005.

NOSTRO, A.; BISIGNANO, G.; CANNATELLI, M. A.; CRISAFI, G.; GERMANO, M. P.; ALONZO, V. Effects of *Helichysum italicum* extract on growth and enzymatic activity of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 17, n. 6, p. 517-520, 2001.

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.

NUNES, X. P.; PEREIRA, M. S. V.; BARBOSA-FILHO, J. M.; CUNHA, E. V. L. Preliminary study of the antimicrobial activity of *Mentha x villosa* Hudson essential oil, rotundifolone and its analogues. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 16, n. 3, p. 307-311, 2006.

OLIVEIRA, A. de M.; GONÇALVES, M. O.; SHINOHARA, N. K. S.; STAMFORD, T. L. M. Manipuladores de Alimentos: um fator de risco. **Revista Higiene Alimentar**. v. 17, n. 114/115, p. 12-18, 2003.

OLIVEIRA, C. E. V. de; STAMFORD, T. L. M.; GOMES NETO, N. J.; SOUZA, E. L. de. Inhibition of *Staphylococcus aureus* in broth and meat broth using synergies of phenolics and organic acids. **International Journal of Food Microbiology**. v. 137, n. 2-3, p. 312–316, 2010.

OLIVEIRA, F. P.; LIMA, E. O.; SIQUEIRA JÚNIOR, J. P.; SOUZA, E. L.; SANTOS, B. H. C.; BARRETO, H. M. Effectiveness of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical material. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 16, n. 4, p. 510-516, 2006.

OPALCHENOVA, G.; OBRESHKOVA, D. Comparative studies on the activity of basil - an essential oil from *Ocimum basilicum* L. - against multidrug resistant clinical isolates of the genera *Staphylococcus*, *Enterococcus* and *Pseudomonas* by using different test methods. **Journal of Microbiological Methods**. v. 54, n. 1, p. 105-110, 2003.

- 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, 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, 2006.
- OYEDJI, O. A.; AFOLAYAN, A. J. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of the South African *Mentha longifolia*. **Journal of Essential Oil Research**. v.18, p. 57-59, 2006.
- PALLERONI, N. J. **Introduction to the aerobic pseudomonads**. In: Collier L, Balows A, Sussman M., editors. Topley & Wilson's microbiology and microbial infections-Systematic bacteriology. 9. New York, p.1091-108, 1998.
- PALMEIRA-JUNIOR, S. F.; ALVES, F. S. M.; VIEIRA, L. F. A.; CONVERSA, L. M.; LEMOS, R. P. L. Constituintes químicos das folhas de *Croton sellowii* (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 16, n. 3, p. 397-402, 2006.
- PALÚ, A. P.; GOMES, L. M.; MIGUEL, M. A. L.; BALASSIANO, I. T.; QUEIROZ, M. L. P.; FREITAS-ALMEIDA, A. C.; OLIVEIRA, S. S. Antimicrobial resistance in food and clinical *Aeromonas* isolates. **Food Microbiology**. v. 23, n. 5, p. 504-509, 2006.
- PAX, F.; HOFFMAN H. **Die Nturlichen pflanzenfamilien**. 2<sup>a</sup>ed. In: Engler, A.; Prantl, K. (Ed). Leipzig: Engelmann, p.208, 1931.
- PELCZAR, M. J. JR.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia conceitos e aplicações**. 2<sup>a</sup> ed. São Paulo: Editora Makron Books, 1996, 517 p.
- PEREIRA FILHO, J. M. **Efeitos do pastoreio alternado ovinocaprino sobre a composição florística da vegetação herbácea de uma caatinga raleada**. 1995. 86p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1995.
- PEREIRA, M. C.; VILELLA, G. R.; COSTA, L. M. A. S.; SILVA, R. F.; FERNANDES, A. F.; FONSECA, E. W. N.; PICOOLI, R. H. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciência de Agrotecnologia**. v. 30, n. 4, p. 731-738, 2006.
- PEREIRA, R. S.; SUMITA, T. C.; FURLAN, M. R.; JORGE, A. O. C.; UENO, M. Atividade Antibacteriana de óleos essenciais em cepas isoladas de infecção urinária. **Revista de Saúde Pública**. v. 38, n. 2, 2004.
- PERES, L. E. P. **Metabolismo secundário**. Piracicaba – São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. ESALQ/USP, 2004. p. 01 - 26.
- PINTO, C. L. O. **Bactérias psicrotóxicas proteolíticas do leite cru refrigerado granelizado destinado à produção de leite UHT**. 2004. 97p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

POPOFF, M. Y.; LE MINOR, L. E. The genus *Salmonella*. In: BRENNER, D.J.; KRIEG, N.R.; STALEY, J.T., eds. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2.ed. New York: Springer, 2005. v.2, p.764-799.

POPOFF, M. Y.; LE MINOR, L. E. **Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars**. 7.ed. Paris: Institut Pasteur, WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, 1997. 4p.

POPOFF, M. Y.; BOCKEMUHL, J.; GHEESLING, L. L., Supplement 2001 (n° 45) to the Kauffmann – White scheme. **Research in Microbiology**. Paris, v. 154, p. 173-174, 2003.

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

POTTER, N. N.; HOTCHKISS, J. H. **Ciencia de los alimentos**. 5. ed. Zaragoza: Acribia, 2007.

PRANOTO, Y.; RAKSHIT, S. K.; SALOKHE, V. M. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie (LWT)**. v. 38, n. 8, p. 859-865, 2005.

PRASSAD, M. M.; SEENAYYA, G. Effect of spices on the growth of red halophilic cocci isolated from salt cured fish and solar salt. **Food Research International**. v. 33, n. 9, p. 793-798, 2000.

PRIPDEEVECH, P.; CHUKEATIROTE, E. Chemical compositions, antifungal and antioxidant activities of **essential oil** and various extracts of *Melodorum fruticosum* L. flowers. **Food and Chemical Toxicology**. v. 48, n. 10, p.2754-2758, 2010.

QUINN, P. J.; MARKEY, B.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre: Editora Artmed, 2005. 512p.

RABELO, M. **Avaliação do efeito antiedematogênico e antinociceptivo do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* (OEOG) Labiatae**. 2003. 116p. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2003.

RADHRAKRISHANAN-SRIDHAR, S.; VELUSAMY-RAJAGOPAL, R.; RAMASAMY-RAJAVEL, R. Antifungal activity of some essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 51, n. 26, p. 7596-7599, 2003.

RADULESCU, V.; CHILIMENT, S.; OPREA, E. Capillary gas chromatography-mass spectrometry of volatile and semi-volatile compounds of *Salvia officinalis*. **Journal Chromatography A**. v.1027, n.1/2, p.121-126, 2004.

RADULOVIC, N.; MANANJARASOA, E.; HARINANTENAINA, L.; YOSHINORI, A. Essential oil composition of four *Croton* species from Madagascar and their chemotaxonomy. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 34, n. 8, p. 648-653. 2006.

- RAHMAN, A.; KAN, S. C. *In vitro* control of food-borne and food spoilage bacteria by essential oil and ethanol extracts of *Lonicera japonica* Thunb. **Food Chemistry**. v. 116, n. 3, p. 670-675, 2009.
- 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. (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 14, n. 2, 89-96. 2004.
- REHDER, V. L. G.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; SARTORATTO, A.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T. Composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Origanum applii* e *Origanum vulgare*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciais**. v. 6, n. 2, p.67-71, 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.
- RIBEIRO, D. A. ***Escherichia coli* isoladas de água de consumo: caracterização fenotípica e genotípica das propriedades de virulência**. 2006. 95f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.
- RIBEIRO-FURTINI, L. L.; ABREU, L. R. Utilização de APPCC na indústria de alimentos. **Ciência e Agrotecnologia**. v. 30, n. 2, p. 358-363, 2006.
- RIEDEL, G. **Controle sanitário dos alimentos**. Atheneu: Rio de Janeiro, 2005. 455p.
- ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e farmacobiotechnologia**. São Paulo: Premier, 1997, 372p.
- RODGERS, S. Preventing non-fermented refrigerated foods with microbial cultures – A Review. **Trends in Food Science & Technology**. v. 12, n. 8, p. 276-284, 2001.
- ROENGSUMRAM, S.; SOMMIT, A. D.; PETSOM, A.; VILAIVAN, T. Labdane diterpenoids from *Croton oblongifolius*. **Phytochemistry**. v. 50, n. 3, p.449-453, 1999.
- ROSSI, D.; BRUNI, R.; BIANCHI, N.; CHIARABELLI, C.; GAMBARI, R.; MEDICI, A.; LISTA, A.; PAGANETTO, G. Evaluation of the mutagenic, antimutagenic and antiproliferative potential of *Croton lechleri*. **Phytomedicine**. v. 10, n. 2/3, p. 139-144, 2003.
- RÓVIK, L. M.; AASE, B.; ALVESTAD, T.; CAUGANT, D. A. Molecular epidemiological survey of *Listeria monocytogenes* in broilers and poultry products. **Letters in Applied Microbiology**. v. 94, n. 4, p. 633-640, 2003.
- ROWAN, N. J. Evidence that inimical food-preservation barriers alter microbial resistance, cell morphology and virulence. **Trends in Food Science and Technology**. v. 10, n. 8, p. 261-270, 1999.
- RUSSO, T. A.; JOHNSON, J. R. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. **Journal of Infectious Diseases**. v. 181, n. 5, p. 1753-1754, 2000.

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**. v. 91, n. 4, p. 621-632, 2005.

SAEI-DEHKORDI, S. S.; TAJIK, H.; MORADI, M.; KHALIGHI-SIGAROODI F. Chemical composition of **essential oils** in *Zataria multiflora* Boiss. from different parts of Iran and their radical scavenging and antimicrobial activity. **Food and Chemical Toxicology**. v. 48, n. 6, p. 1562-1567, 2010.

SAGDIÇ, O. Sensitivity of four pathogens pathogenic bacteria to Turkish thyme and oregano hydrossols. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**. v. 36, n. 5, p. 467-473, 2003.

SAHIN, F.; GÜLLÜCE, M.; DAFERERA, D; SÖKMEN, A.; SÖKMEN, M.; POLISSIOU, M.; AGAR, G.; ÖZER, H. Biological activities of essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp.vulgare in the Eastern Anatolia region of Turkey. **Food Control**. v. 15, n. 4, p. 549-557, 2004.

SAITO, M. L.; SCRAMIN, S. **Plantas aromáticas e seu uso na agricultura**. Jaguariúna: EMPRABA, 2000, 48p.

SALGADO, A. P. S. **Efeito da luz na planta e no óleo essencial de tomilho** (*Thymus vulgaris*). 2005. 49 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.

SALYERS, A. A.; WHITT, D. D. **Bacterial pathogenesis: a molecular approach**. Washington: ASM Press, 1994. 418p.

SAMELIS, J.; BEDIE, G. K.; SOFOS, J. N.; BELK, K. E.; SCANGA, J. A.; SMITH, G. C. Combinations of nisin with organic acids or salts to control *Listeria monocytogenes* on sliced pork bologna stored at 4°C in vacuum packages. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie (LWT)**. v. 38, n. 1, p. 21-28, 2005.

SANTOS, A. S.; ANDRADE, E. H. A.; ZOGHBI, M. G. B.; LUZ, A. I. R.; MAIA, J. G. S. Sesquiterpenes on Amazonian Piper Species. **Acta Amazonica**. v. 28, n. 2, p. 127-130, 1998.

SANTOS, F. A.; JEFERSON, F. A.; SANTOS, C. C.; SILVEIRA, E. R.; RAO, V. S. N. Antinociceptive effect of leaf essential oil from *Croton sonderianus* in mice. **Life Sciencia**. v. 77, n. 23, p. 2953-2963, 2005.

SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. **Phytotherapy Research**. v. 14, n. 4, p. 240–244, 2000.

SANTOS, M. G. dos, DIAS PINTO, A. G.; MARTINS, M. M. Conhecimento e uso da medicina alternativa entre alunos e professores de primeiro grau. **Revista de Saúde Pública**. v. 29, n. 3, p. 221-227, 1995.

SANTOS, R. I. Metabolismo Básico e Origem dos Metabólitos Secundários. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.;

PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 5 ed. Porto Alegre, RS: Ed. Da UFSC, 2004. 1102 p.

SAVELEV, S.; OKELLO, E.; PERRY, N. S. L.; WILKINS, R. M.; PERRY, E. K. Synergistic and antagonistic interactions of anticholinesterase terpenoids in *Salvia lavandulaefolia* essential oil. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. v. 75, n. 3, p. 661-668, 2003.

SCHERRER, D.; CORTI, S.; MUEHLHERR, J. E.; ZWEIFEL, C.; STEPHAN, R. Phenotypic and genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from raw bulk-tank milk samples of goats and sheep. **Veterinary Microbiology**. v. 101, n. 2, p. 101-107, 2004.

SEIDL, P.R. Pharmaceuticals from natural products: current trends. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 74, n. 1, p. 145-1500, 2000.

SEN, K.; RODGERS, M. Distribution of six virulence factors in *Aeromonas* species isolated from US drinking water utilities: PCR identification. **Journal of Applied Microbiology**. v. 97, n. 5, p. 1077-1086, 2004.

SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L. **Biotecnologia na Agricultura e na agroindústria**. Guaíba Agropecuária, 2001, 463 p.

SHAFI, P. M.; ROSAMMA, M. K.; JAMIL, K.; REDDY, P. S. Antibacterial activity of *Syzygium cumini* and *Syzygium travancoricum* leaf essential oil. **Fitoterapia**. v. 73, n. 5, p. 414-416, 2002.

SHAN, B.; CAI, Y. Z.; BROOKS, J. D.; CORKE, H. The *in vitro* antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. **International Journal of Food Microbiology**. v. 117, n. 1, p. 112-119, 2007.

SILVA, A. C. O. da; ALBUQUERQUE, U. O. de. Woody medicinal plants of the caatinga in the state of Pernambuco (Northeast Brazil). **Acta Botanica Brasilica**, v. 19, n. 1, p. 17-26, 2005.

SILVEIRA, E. R. **Contribuição ao conhecimento químico de plantas nativas do Nordeste – *Croton sonderianus* Muell. Arg.** 1979. Tese (Doutorado em Química orgânica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1979.

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

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

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. – Porto Alegre: Universidade/UFRGS; Florianópolis: Ed. UFSC, p. 467-495, 2003.

SINICO, C.; DE LOGU, A.; LAI, F.; VALENTI, D.; MANCONI, M.; LOY, G.; BONSIGNORE, L.; FADDA, A. M. *Liposomal incorporation of Artemisia arborescens* L. essential oil and *in vitro* antiviral activity. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 59, n.1, p.161-168, 2005.

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. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 91, n. 6, p.1011-1022, 2001.

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

SOCORRO, S. R. M. S.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; BIZZO, H. R.; ALMEIDA, R. I.; SOARES, R. M.; SOUTO-PADRON, T.; ALVIANO, C. S.; LOPES, A. H. Antileishmanial activity of a linaloolrich essential oil from *Croton cajucara*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v. 47, n. 6, p. 1895-1901, 2003.

SOLIMAN, K. M.; BADEAA, R. I. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. **Food chemical toxicology**. v. 40, n. 11, p.1669–1675, 2002.

SOUSA, C. P. Pathogenicity mechanisms of prokaryotic cells: an evolutionary view. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v. 7, n. 1, p. 26-31, 2003.

SOUZA, E. L.; LIMA, E. O.; FREIRE, K. R. L.; SOUSA, C. P. Inhibition action of some essential oils and phytochemicals on the growth of moulds isolated from foods. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 48, n. 2, p. 245-250, 2005.

SUAREZ, A. I.; COMPAGNONE, R. S.; SALAZAR-BOOKAMAN, M. M.; TILLET, S.; DELLE MONACHE, F.; DI GIULIO, C.; BRUGES, G. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Croton malambo* bark aqueous extract. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 88, n. 1, p. 11-14, 2003.

SUÑEN, E.; ARISTIMUÑO, C.; FERNANDEZ-GALIAN, B. Activity of smoke Wood condensates against *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* in vacuum-packaged, cold-smoked rainbow trout stored at 4°C. **Food Research International**. v. 36, n. 2, p. 111-116, 2003.

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

TAKAISI-KIKUNI, N. B.; TSHILANDA, D.; BABADY, B. Antibacterial activity of the essential oil of *Cymbopogon densiflorus*. **Fitoterapia**. v. 71, n. 1, p. 69-71, 2000.

TAKHISTOV, P.; GEORGE, B. Early events and pattern formation in *Listeria monocytogenes* biofilms. **Biofilms**. v. 1, n. 4, p. 351-359, out. 2004.

TALLY, F. P.; BARG, N. L. **Estafilococos: Abscessos e Outras Doenças**. IN: Schachter M et al. (Editores). *Microbiologia: Mecanismos das Doenças Infecciosas* 3ed. Guanabara Koogan AS, p.120-127, 2002.

TASSOU, C. C.; KOUTOUMANIS, K.; NYCHAS, G. J.E. Inhibition of *Salmonella enteritidis* and *Saphylococcus aureus* in nutrient broth by mint essential oil. **Food Research International**. v. 33, n. 3/4, p. 273-280, 2000.

TEPE, B.; DONNEY, E.; UNLU, M.; CANDAN, F.; DAFERERA, D.; UNLU, 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) *S. multicaulis* (Vahl). **Food Chemistry**. v. 84, n. 1, p. 519-525, 2004.

THONGTAN, J.; KITTAKOOP, P.; RUANGRUNGSI, N.; SAENBOONRUENG, J.; THEBTARONONTH, Y. New antimycobacterial and antimalarial 8,9-secokaurane diterpenes from *Croton kongensis*. **Journal of Natural Products**. v. 66, n. 6, p. 868-870, 2003.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6a ed. Porto Alegre: Artmed editora, 2000, 827p.

TRABULSI, L. R. **Microbiologia**. 5ª edição. São Paulo: Atheneu, 2008, 780p.

TRENTIN, A. P.; SANTOS, A.R.; GUEDES, A.; PIZZOLATTI, M. G.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B.; Antinociception caused by the extract of *Hedyosum brasiliense* and its active principle, the sesquiterpene lactone 13-hydroxy-8, 9-dehydrozukanolide. **Planta Medica**. v. 65, n. 6, p. 517-521, 1999.

TRISTAN, A.; FERRY, T.; DURAND, G.; DAUWALDER, O.; BES, M.; LINA, G.; VANDENESCH, F.; ETIENNE, J. Virulence determinants in community and hospital meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Hospital Infection**. v. 65(Suppl. 2), p. 105-109, 2007.

TSIGARIDA, T.; SKANDAMIS, P.; NYCHAS, G. J. E. Behaviour of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat estored under aerobic, vaccum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5°C. **Journal of Applied Microbiology**. v. 89, n. 6, p. 901-909, 2000.

TURGIS, M.; HAN, J.; CAILLET, S.; 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.

TYAGI, A. K.; MALIK, A. Antimicrobial potential and chemical composition of *Eucalyptus globulus* oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms. **Food Chemistry**. v. 126, n. 1, p. 228-235, 2011.

UPNMOOR, I. **Cultivo de plantas medicinais, aromáticas e condimentares**. Guaíba Agropecuária. 2003, 56 p.

VALERO, M.; SALMERÓN, M. C. Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. **International Journal of Food Microbiology**. v. 85, n. 1/2, p. 73-81, 2003.

VAN AMSON, G.; HARACEMIV, S. M. C.; MASSON, M. L. Levantamento de dados epidemiológicos relativos à ocorrências/ surtos de doenças transmitidas por alimentos

(DTAs) no Estado do Paraná Brasil, no período de 1978 a 2000. **Ciência e Agrotecnologia**. v. 30, n. 6, p. 1139-1145, 2006.

VAN ASTEN, A. J.; VAN DIJK, J. E. Distribution of "classic" virulence factors among *Salmonella* spp. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. v. 44, n. 3, p. 251-259, 2005.

VASQUEZ-BOLAND, J. A.; KUHN, M.; BERCHE, P.; CHAKRABORTY, T.; DORNINIQUEZ-BERNAL, G.; GOEBEL, W.; GONZALEZ-ZORN, B.; WEHLAND, J.; KREFT, J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 14, n. 3, p. 584-640, 2001.

VATTEM, D. A., LIN, Y. T., LABBE, R. G., SHETTY, K. Phenolic antioxidant mobilization in Cranberry pomace by solid-state bioprocessing using food grade fungus *lentinus Edodes* and effect on antimicrobial activity against select food-borne pathogens. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**. v. 5, n. 1, p. 81-91, 2004.

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.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas Mediciniais: cura segura?. **Química Nova**. v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VELICKOVIC, D. T.; RANDJELOVIC, N. V.; RISTIC, M. S.; SMELCEROVIC, A. A.; VELICKOVIC, A. S. Chemical composition and antimicrobial action of the ethanol extracts of *S. pratensis* L. *S. glutinosa* L. *S. aethiops* L. **Journal Serbia Chemical Society**. v. 67, n. 10, p. 639-646, 2002.

WALLS, I.; BUCHANAN, R. L. Use of food safety objectives as a tool for reducing foodborne listeriosis. **Food Control**. v. 16, n. 9, p. 795-799, 2005.

WHO. World Health Organization. **Food Safety and Foodborne Illness**. Fact Sheet n. 237. World Health Organization, Reviewed March, 2007.

WHO. World Health Organization. **Food and Health in Europe: a new basis for action**. Regional Publications European Studies. 96, 2004.

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.