

DENIS OKOBA

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS
HIDROALCÓOLICOS DE FRUTOS DO PANTANAL: *Byrsonima
cydoniifolia* A. Juss. (Canjiqueira), *Pouteria glomerata* (Miq.)
Radlk. (Laranjinha de pacu) e *Vitex cymosa* Bert. (Tarumã).**

CAMPO GRANDE – MS

2016

DENIS OKOBA

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS
HIDROALCÓOLICOS DE FRUTOS DO PANTANAL: *Byrsonima
cydoniifolia* A. Juss. (Canjiqueira), *Pouteria glomerata* (Miq.)
Radlk. (Laranjinha de pacu) e *Vitex cymosa* Bert. (Tarumã).**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Saúde e Desenvolvimento da Região
Centro-Oeste da Universidade
Federal de Mato Grosso do Sul, para
obtenção do título de Mestre.

Orientador: Profa. Dra. Priscilla Aiko
Hiane

Co-orientador: Profa. Dra. Luciana
Miyagusku

CAMPO GRANDE-MS

2016

DENIS OKOBA

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS
HIDROALCÓOLICOS DE FRUTOS DO PANTANAL: *Byrsonima
cydoniifolia* A. Juss. (Canjiqueira), *Pouteria glomerata* (Miq.)
Radlk. (Laranjinha de pacu) e *Vitex cymosa* Bert. (Tarumã).**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Saúde e Desenvolvimento da Região
Centro-Oeste da Universidade
Federal de Mato Grosso do Sul, para
obtenção do título de Mestre.

Resultado _____

Campo Grande - MS, _____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Priscila Aiko Hiane

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL

Profa. Dra. Maria Isabel Lima Ramos

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL

Profa. Dra. Raquel Pires Campos

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL

Profa. Dra. Luciana Miyagusku

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL

AGRADECIMENTOS

A Deus por enviar pessoas especiais que me auxiliaram a realizar esse sonho.

Aos meus pais e irmãos por sempre estarem me encorajando em todas as minhas conquistas da vida.

A minha orientadora, Profa. Dra. Priscilla Aiko Hiane e a minha co-orientadora, Profa. Dra. Luciana Miyagusku, pela oportunidade, incentivo e apoio para concluir esta pesquisa.

A Profa. Dra. Raquel Pires Campos por sua valiosa contribuição na formulação deste estudo no decorrer da pós-graduação.

Aos professores que aceitaram fazer parte da minha banca de defesa, por seus conhecimentos e orientações.

Aos técnicos dos laboratórios de Microbiologia de Alimentos e Físico-química, Lúcia, Mariana, Ulana, Camilla, Iluska, Osmar, Mauricio e Márcio, pela ajuda desde a coleta dos frutos e na execução dos experimentos.

A mestre Fabiola Brandão dos Santos por sua competência e dedicação desde o início até a conclusão desta pesquisa.

Aos alunos de graduação Paula Hidemi e Dayenne Martins pela ajuda durante a execução laboratorial da pesquisa.

A Universidade Federal de Mato Grosso do Sul através do Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste, pela oportunidade proporcionada para cursar o mestrado.

RESUMO

O ecossistema do Pantanal é composto por uma grande variedade de espécies de plantas frutíferas que podem contribuir para as pesquisas que buscam alternativas para os antibióticos e conservantes químicos utilizados na indústria de alimentos. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos dos frutos do Pantanal: *Byrsonima cydoniifolia* A. Juss. (canjiqueira), *Pouteria glomerata* (Miq.) Radlk. (laranjinha de pacu) e *Vitex cymosa* Bert. (tarumã). Foram utilizados os ensaios de difusão em disco e microdiluição em caldo para determinar a capacidade antimicrobiana dos extratos. O antibiograma das cepas foi realizado utilizando azitromicina 15 µg como controle positivo em todos os ensaios. No teste de difusão em disco, os extratos dos três frutos mostraram halos de inibição sensíveis frente a *Listeria monocytogenes*, enquanto a *Escherichia coli* e *Salmonella* spp foram menos sensíveis nas concentrações testadas. O antibiograma mostrou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os halos de inibição da azitromicina e dos extratos dos frutos. A concentração inibitória mínima (CIM) foi de 703,13 µg mL⁻¹ com os extratos das sementes de canjiqueira e laranjinha de pacu, sendo mais ativos do que os extratos da casca com polpa frente as bactérias selecionadas. Os extratos da semente verde e da casca com polpa verde de tarumã inibiram a *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*, enquanto os da semente madura e da casca com polpa madura inibiram a *Salmonella* spp e a *Listeria monocytogenes*. Alguns extratos de canjiqueira e laranjinha de pacu foram bactericidas contra a *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp, enquanto os demais extratos que inibiram o crescimento bacteriano foram bacteriostáticos. Os frutos testados demonstraram capacidade antimicrobiana, porém, estudos futuros são necessários para esclarecer os seus mecanismos de ação e sua possível incorporação na indústria de alimentos.

Palavras chaves: Pantanal, antimicrobianos naturais, conservantes químicos, antibióticos promotores de crescimento

ABSTRACT

The Pantanal ecosystem is comprised of a wide variety of species of fruit trees that can contribute to research that seek alternatives to antibiotics and chemical preservatives used in the food industry. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial activity of hydroalcoholic extracts of the Pantanal fruits: *Byrsonima orbignyana* A. Juss. (Canjiqueira), *Pouteria glomerata* (Mic.) Radlk. (Laranjinha pacu) and *Vitex cymosa* Bert. (Tarumã). The disk diffusion and broth microdilution tests were used to determine the antimicrobial ability of the extracts. Antibiogram of the strains was performed, using azithromycin 15 µg as a positive control in all tests. In the disk diffusion test, the extracts of the three fruits showed sensitive inhibition zones against *Listeria monocytogenes*, while *Escherichia coli* and *Salmonella* spp were less sensitive in the concentrations tested. The antibiogram showed significant differences ($p < 0.05$) between the inhibition zones of azithromycin and fruit extracts. The minimum inhibitory concentration (MIC) was 703.13 µg mL⁻¹ with the seed extracts of canjiqueira and laranjinha pacu, being more active than the extracts of the peel with pulp against the selected bacteria. Extracts from the green seed and from the green peel with pulp of tarumã, inhibited *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*, while the extracts from the mature seed and from the mature peel with pulp inhibited *Salmonella* spp and *Listeria monocytogenes*. Some extracts of canjiqueira and laranjinha pacu were bactericidal against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp, while the other extracts that inhibited bacterial growth were bacteriostatic. The fruits tested showed antimicrobial capacity however, further studies are required to clarify their mechanisms of action and their possible incorporation in the food industry.

Key words: Pantanal, natural antibiotics, chemical preservatives, growth-promoting antibiotics

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Diâmetros dos halos de inibição do crescimento microbiano pelo teste de difusão em disco utilizando extrato hidroalcólico de <i>Byrsonima cydoniifolia</i> A. Juss..... | 35 |
| Tabela 2 – Diâmetros dos halos de inibição do crescimento microbiano pelo teste de difusão em disco utilizando extrato hidroalcólico de <i>Pouteria glomerata</i> (Miq.) Radlk..... | 36 |
| Tabela 3 – Diâmetros dos halos de inibição do crescimento microbiano pelo teste de difusão em disco utilizando extrato hidroalcólico de <i>Vitex cymosa</i> Bert..... | 37 |
| Tabela 4 – Média dos diâmetros, dos halos de inibição do crescimento microbiano no antibiograma das cepas..... | 38 |
| Tabela 5 – Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração microbicida mínima (CMM) em $\mu\text{g mL}^{-1}$, dos extratos de <i>Byrsonima cydoniifolia</i> A. Juss..... | 41 |
| Tabela 6 – Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração microbicida mínima (CMM) em $\mu\text{g mL}^{-1}$, dos extratos de <i>Pouteria glomerata</i> (Miq.) Radlk..... | 42 |
| Tabela 7 – Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração microbicida mínima (CMM) em $\mu\text{g mL}^{-1}$, dos extratos de <i>Vitex cymosa</i> Bert..... | 43 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Frutos de canjiqueira (<i>Byrsonima cydoniifolia</i> A. Juss.) em processo de maturação..... | 14 |
| Figura 2 - Frutos de Laranjinha de pacu (<i>Pouteria glomerata</i> (Miq.) Radlk) em diferentes estados de maturação..... | 16 |
| Figura 3 – Frutos maduros de Tarumã (<i>Vitex cymosa</i> Bert.)..... | 17 |
| Figura 4 – Reação de oxirredução da resazurina..... | 33 |
| Figura 5 – Antibiograma mostrando a diferença de diâmetro entre os halos de inibição do controle positivo e dos antibióticos selecionados contra a <i>Listeria monocytogenes</i> . Os valores representam a média \pm desvio padrão..... | 38 |
| Figura 6 – Representação do ensaio revelado com resazurina a 0,01%..... | 44 |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 11 |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA | 13 |
| 2.1 O ecossistema do Pantanal brasileiro | 13 |
| 2.2 Espécies vegetais | 13 |
| 2.2.1 <i>Byrsonima cydoniifolia</i> A. Juss. (Canjiqueira)..... | 14 |
| 2.2.2 <i>Pouteria glomerata</i> (Miq.) Radlk. (Laranjinha de pacu)..... | 15 |
| 2.2.3 <i>Vitex cymosa</i> Bert. (Tarumã)..... | 16 |
| 2.3 Plantas como alternativas para os antibióticos e conservantes químicos | 18 |
| 2.4 Metabolitos secundários das plantas com atividade antibacteriana ... | 19 |
| 2.5 Antibióticos e Conservantes Químicos na Cadeia Produtiva de Carnes | 20 |
| 2.5.1 Antibióticos como Promotores de Crescimento | 20 |
| 2.5.2 Conservantes químicos na Produção de Carnes | 21 |
| 2.6 Microrganismos e Doenças Transmitidas por Produtos Cárneos | 22 |
| 2.6.1. Microrganismos Patogênicos de Carnes | 23 |
| 2.6.1.1. <i>Escherichia coli</i> | 23 |
| 2.6.1.2. <i>Salmonella</i> spp..... | 24 |
| 2.6.1.3. <i>Listeria monocytogenes</i> | 25 |
| 2.7 Impacto na saúde pública dos antibióticos e conservantes químicos usados na cadeia produtiva de carnes | 26 |
| 3 OBJETIVOS | 28 |
| 3.1 Objetivo Geral | 28 |
| 3.2 Objetivos Específicos | 28 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS | 29 |
| 4.1 Coleta dos Frutos | 29 |
| 4.2 Processamento dos Frutos | 29 |
| 4.3 Preparo dos Extratos Hidroalcoólicos | 30 |
| 4.4 Obtenção das Cepas | 30 |
| 4.5 Preparo dos Meios de Cultura | 30 |
| 4.6 Preparo do Inóculo Bacteriano | 31 |

| | |
|---|----|
| 4.7 Ensaio de Difusão de Disco | 31 |
| 4.7.1 Antibiograma das cepas..... | 32 |
| 4.7.2 Análises Estatísticas..... | 32 |
| 4.8 Determinação da Concentração Inibitória Mínima dos Extratos | 32 |
| 4.8.1 Leitura com Revelador..... | 33 |
| 4.9 Determinação da Concentração Microbica Mínima dos Extratos | 34 |
| 5 RESULTADOS | 35 |
| 5.1 Teste de Difusão em Disco | 35 |
| 5.1.1 Antibiograma das cepas..... | 37 |
| 5.1.2 Comparação da atividade inibitória dos frutos contra os microrganismos..... | 39 |
| 5.2 Teste da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração microbica mínima (CMM). | 40 |
| 5.2.1 Comparação dos valores de CIM e CMM contra os microrganismos | 44 |
| 6 DISCUSSÃO | 46 |
| 7 CONCLUSÕES | 53 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 54 |

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma das maiores biodiversidades do mundo, tendo mais de 20% do número total de espécies conhecidas que vem acompanhada por uma ampla aceitação do uso de plantas medicinais pela sua população como um recurso importante para os cuidados primários de saúde (HARAGUCHI e CARVALHO, 2010).

Algumas substâncias são naturalmente produzidas pelas plantas, os chamados compostos fitoquímicos, que podem ser classificados como isoflavonóides, indóis, fitoesteróis, polissacarídeos, sesquiterpenos, alcaloides, glucanas e taninos, na tentativa de se adaptar as condições adversas do meio ambiente, tais como variação de temperatura e proteção contra predadores, além de possuir propriedades funcionais com ação antimicrobiana, antioxidante, antimutagênico e imunomoduladora (KUSAMRAN et al., 1998; WILLIAMS, 2001).

Portanto, observa-se que as plantas possuem recursos imensos que são fundamentais para a obtenção de meios para realizar tratamentos terapêuticos (FIGUEREDO, 2013). Ainda, segundo Rodrigues e Amaral (2012), a utilização das plantas medicinais como recurso fitoterápico é fundamental na descoberta de novos fármacos assim tornando o reino vegetal uma importante fonte natural de medicamentos.

Entretanto, o uso incorreto desses fármacos sintéticos pela população, tem resultado no desenvolvimento de bactérias resistentes como *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes*, originando efeitos preocupantes sobre a saúde humana, uma vez que estas bactérias resistentes têm sido veiculadas ao homem, principalmente, por meio de produtos animais e conseqüentemente, têm diminuído a eficácia dos fármacos utilizados (HARADA e ASAI, 2010).

Ainda, nas últimas décadas, observou-se uma resistência crescente de microrganismos deterioradores e patogênicos mediante agentes antimicrobianos utilizados para a conservação de alimentos como os ácidos orgânicos fracos, peróxido de hidrogênio, agentes quelantes entre outros conservantes químicos (OSTROSKY et al., 2008).

Em decorrência disso, tem sido um desafio para as indústrias de alimentos cumprirem as exigências legais para garantir a segurança dos alimentos; exigências que são relacionadas às demandas dos consumidores preocupados com a sua saúde e ao mesmo tempo, conscientes dos possíveis efeitos dos aditivos sintéticos utilizados na conservação dos alimentos. Além disso, a atual necessidade por alimentos de boa qualidade, minimamente processados, livres de conservantes químicos, mas com vida útil prolongada, têm tornado essa busca cada vez mais pertinente (MACHADO et al., 2011).

Sendo uma fonte rica de vários metabólitos secundários, diversos estudos têm relatado a eficácia dos extratos das plantas como agentes antimicrobianos contra os microrganismos deterioradores e patogênicos, carregados por alimentos (BUSATTA et al., 2008; CARRAMIÑANA et al., 2008).

O presente estudo determinou a atividade antimicrobiana dos extratos de três frutos nativos do Pantanal verdes e maduros, avaliando a contribuição desses frutos para esta pesquisa que busca alternativas para antibióticos e conservantes químicos utilizados em alimentos.

2. REVISAO DA LITERATURA

2.1. O ecossistema do Pantanal brasileiro.

O bioma do Pantanal é localizado na região centro sul do continente Sul-americano e abrange países como o Brasil, a Bolívia e o Paraguai e tem a maior parte de sua área localizada em terras brasileiras. No Brasil, os estados ocupados pelo Pantanal são o Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, sendo que os municípios de Corumbá, Poconé, Cáceres e Aquidauana têm maior contribuição em área para a formação deste bioma (FERREIRA, 2013).

Segundo Brandão et al. (2011), este ecossistema possui ampla biodiversidade em termos de flora e fauna, além das unidades de paisagem que são decorrentes da influência de biomas importantes localizados em torno da região pantaneira tais como: a Floresta Amazônica, o Cerrado e o Chaco.

A vegetação pantaneira é composta por uma vasta variedade de espécies de plantas, distribuídas em paisagens campestres, aquáticas, gramíneo-lenhosas e florestadas. Estas espécies são caracterizadas por uma grande diversidade de plantas frutíferas com alto valor biológico e nutricional que se destacam por suas características sensoriais peculiares além de possuir substâncias com atividades antimicrobianas e outras substâncias farmacologicamente ativas (SANTOS et al., 2009).

A diversidade da flora pantaneira tornou-se pertinente à adoção de desenvolvimento sustentável por meio de ações produtivas da região. Essas ações podem ser alcançadas através da utilização de incentivos fiscais para produtores rurais e para a comunidade local envolvidos na conservação das espécies nativas e plantas desta região (MACHADO e AGUIAR, 2010).

2.2. Espécies vegetais.

A comprovação de que as espécies de plantas possuem recursos que trazem benefícios a saúde, além de gerar efeitos fisiológicos saudáveis, tem incentivado estudos mais elaborados sobre suas propriedades funcionais (SILVA, 2010). Entre as espécies frutíferas encontrados no Pantanal e que possuem diversas propriedades funcionais, destacam-se a *Byrsonima*

cydoniifolia A. Juss (canjiqueira), *Pouteria glomerata* (Miq.) Radlk. (laranjinha de pacu) e *Vitex cymosa* Bert. (tarumã).

2.2.1. *Byrsonima cydoniifolia* A. Juss. (canjiqueira)

Popularmente conhecida como canjiqueira ou canjição, a espécie *Byrsonima cydoniifolia* A. Juss é pertencente à família Malpighiaceae. Esta espécie se encontra comumente no Pantanal em diferentes condições ecológicas, tais como em bordas de cordilheiras, capão, campo e cerrado, crescendo tanto em áreas secas quanto em áreas que ficam inundadas na época das chuvas (POTT e POTT, 1994; SANTOS et al., 2008).

Na região do Pantanal, os frutos desta espécie aparecem entre os meses de setembro a março formando aglomerados chamados de canjiqueiras de quais favorecem a sua colheita pelas comunidades locais. Quando maduros, os frutos apresentam uma coloração alaranjada (Figura 1), tendo a sua polpa consumida pelas comunidades locais na forma de sucos, geleia, sorvete e doces (DAMASCENO JÚNIOR e SOUZA, 2010).



Figura 1: Frutos de canjiqueira (*Byrsonima cydoniifolia* A. Juss.) em processo de maturação.

Fonte: PRATES, 2012

Segundo POTT e POTT (2004), a casca do fruto desta planta é fonte de taninos que são responsáveis pelo seu sabor adstringente e que tem sido utilizada pelas comunidades locais para cicatrização de ferimentos, contra infecções intestinais além do tratamento de erisipela. Ainda, compostos fenólicos

e taninos foram encontrados neste fruto, sendo mais pronunciados nos frutos verdes do que nos maduros (PRATES, 2012).

Estudos mostram compostos químicos apresentados pelas espécies do gênero *Byrsonima* sendo observada uma grande diversidade de metabólitos secundários tais como esteróides, terpenos, flavonoides como a rutina e quercetina, taninos, derivados do ácido cinâmico entre outros compostos (RIVERO-CRUZ et al., 2009; GIL et al., 2005).

Michelin et al (2008) estudaram a atividade biológica dos extratos obtidos das folhas das espécies de *Byrsonima* e foi observada atividade microbida contra *B. cereus*, *E. faecalis* e *Shigella* devido a presença de grandes quantidades dos derivados de ácido quínico. Além disso, os derivados de ácido quínico apresentaram ação microbida efetiva frente à *Staphylococcus aureus*, *Bacillus thuringiensis*, *Escherichia coli*, *Salmonella entérica* e *Shigella dysenteriae* (PEREIRA, 2011; ZHANG et al., 2013).

Utilizava-se, até recentemente, o nome científico *Byrsonima orbignyana* A. Juss para a espécie canjiqueira. Porém, após uma revisão taxonômica em trabalhos recentes, foi dado o nome científico de *Byrsonima cydoniifolia* A. Juss para esta espécie e que permanece atualmente (MAMEDE, 2012).

2.2.2. *Pouteria glomerata* (Miq.) Radlk. (laranjinha de pacu)

Conhecida pelos nomes de laranjinha de pacu, moranguinha ou parada, esta espécie pertence à família Sapotaceae. A laranjinha de pacu é normalmente encontrada em regiões da mata ciliar, mata alagável, piauval, em solos siltosos ou argilosos, sendo distribuída no Chaco Oriental e na mata ribeirinha. É considerada um arbusto ou árvore, com ramificações até o solo, de 1-8 metros de altura tendo a sua floração de setembro a dezembro e frutificação de janeiro a agosto (POTT e POTT, 1994).

Os frutos (Figura 2) são carnosos sendo utilizados como isca de peixe pelas comunidades locais além de serem aproveitados para elaboração de sorvetes, sucos e doces (DAMASCENO JÚNIOR e SOUZA, 2010).



Figura 2: Frutos de Laranjinha de pacu (*Pouteria glomerata* (Miq.) Radlk) em diferentes estados de maturação.

Fonte: SILVA, 2010.

Os extratos hidroalcóolicos do fruto de *Pouteria glomerata* (Miq.) Radlk apresentam metabólitos secundários bioativos como taninos e fenóis sendo observadas concentrações maiores desses compostos tanto na polpa quanto na casca deste fruto (BATISTA, 2013). O perfil fitoquímico das folhas das plantas do gênero *Pouteria*, mostra teores consideráveis dos flavonoides, terpenoides, taninos e outros compostos fenólicos (MONTENEGRO et al., 2006; NOGUEIRA, 2012).

Estudos sobre atividade antimicrobiana das espécies do gênero *Pouteria* encontrados na região do Pantanal brasileiro, mostraram atividade inibitória contra as cepas multirresistentes Gram-positivos e Gram-negativos incluindo; *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* (SILVA, 2013; SANTOS et al., 2014)

2.2.3. *Vitex cymosa* Bert. (tarumã)

O tarumã pertence à família Verbenaceae e ocorre desde a região Amazônica, Brasil Central até nas matas ciliares de São Paulo e Mato Grosso do Sul além das várzeas do Pantanal mato grossense. Sua árvore atinge uma média de 10-20 metros de altura, floresce de junho a dezembro e frutifica de janeiro a maio. No estado maduro, os frutos (Figura 3) apresentam uma coloração roxa, com uma semente interna e polpa mucilaginosa de odor

característico. Estes frutos podem ser utilizados na elaboração de geleias e licores (POTT e POTT, 1994; LORENZI, 2002).



Figura 3: Frutos maduros de Tarumã (*Vytex cymosa* Bert.)

Fonte: SILVA, 2010.

A polpa do fruto apresenta compostos químicos tais como potássio, cálcio, magnésio, fósforo e sódio e é rica em vitamina C, além de ser uma fonte de fibras podendo ser benéfico para as crianças e adultos (CALDEIRA et al., 2004).

Estudos mostraram que o extrato da polpa e o da casca de tarumã apresentam consideráveis teores de taninos e de compostos fenólicos (TAVARES e RAMOS, 2012). Leitão et al. (2011), isolaram flavonoides e triterpenos a partir desta espécie, enquanto Fonseca et al. (2006) demonstraram que o óleo essencial deste fruto apresenta atividade antimicrobiana.

Ainda, o potencial antimicrobiano do gênero *Vitex* foi constatado nas pesquisas feitas com os extratos hidroalcoólico do fruto desta planta onde inibiram o crescimento dos microrganismos tais como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus casei* (FONSECA et al., 2006; SANTOS, 2015).

2.3. Plantas como alternativas para os antibióticos e conservantes químicos.

A busca pelas soluções adequadas para antibióticos e conservantes químicos usados em alimentos, tem sido impulsionada pela tendência do consumo de alimentos mais saudáveis, contendo mínimo teores de aditivos sintéticos e com menores efeitos negativos a saúde do consumidor (FAI et al., 2000; BOTRE et al., 2010).

Neste sentido, as pesquisas sobre o uso de antibióticos no ciclo produtivo de carnes têm resultado na descoberta de alternativas como probióticos (microrganismos vivos), prebióticos (carboidratos especificamente utilizados por um grupo de bactérias desejáveis) ácidos orgânicos, enzimas, e mais recentemente, os extratos naturais derivados das plantas (SANTANA et al., 2011).

Devido a sua ação antimicrobiana, os extratos de plantas e seus óleos essenciais são capazes de controlar e inibir o crescimento bacteriano nos intestinos dos animais. Sugere-se então, que o efeito desses compostos é devido a melhor absorção quando incorporado na ração dos animais, resultando na melhor performance desses animais (DORMAN e DEANS, 2000; HERNANDEZ, 2004). Porém, quando administrados em doses maiores, casos de toxicidade podem surgir, sendo necessário a elaboração de estudos mais detalhados sobre estes compostos (TRAESEL et al., 2011).

Existe um grande interesse em estudar a atividade antimicrobiana dos extratos e óleos essenciais das plantas e a sua aplicação na indústria de alimentos como conservante de alimentos (BOTSOGLU et al., 2002). Além disso, a eficácia dos extratos de plantas e os óleos essenciais é evidente quando se trata da sua atividade antimicrobiana sobre os patógenos veiculados por alimentos e principalmente em carnes. Porém, esta atividade antimicrobiana varia quando esses agentes são aplicados em diferentes produtos cárneos (BUSATTA et al., 2008; CARRAMIÑANA et al., 2008).

Portanto, para uma aplicação efetiva em alimentos, esses derivados devem ser submetidos as análises contendo moldes que simulam o alimento, com o objetivo de determinar o efeito da interação entre os constituintes do

alimento com os compostos derivados das plantas, assim impactando na produtividade antimicrobiana dos mesmos (MACHADO et al., 2011).

2.4. Metabolitos secundários das plantas com atividade antibacteriana.

A pesquisa de metabolitos secundários com ação antimicrobiana se apresenta como uma solução para o combate dos microrganismos resistentes aos agentes antimicrobianos comuns. Dentre os compostos químicos das plantas que apresentam potencial antimicrobiano, se destacam os flavonoides, terpenos e óleos essenciais (LIMA et al., 2006; MACHADO et al., 2008).

Os flavonoides pertencem ao grupo dos polifenóis que são derivados do processo de metabolismo secundário das plantas. A natureza dos flavonoides encontrados nas folhas pode variar daqueles presentes em outras partes da planta, assim como a sua concentração que varia dependendo do órgão da planta em que se encontra (SANTOS, 2007; MACHADO et al., 2008). Em relação a atividade antimicrobiana dos flavonoides, destaca-se o seu efeito inibitório contra o crescimento das células bacterianas (CUSHNIE e LAMB, 2011; MICELI et al., 2011).

Os terpenos são substâncias fitoquímicas sintetizadas a partir de unidades de acetil coenzima A encontradas nas plantas. Os terpenos e seus derivados possuem atividade antimicrobiana contra diversos microrganismos tais como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* (CHUNG et al., 2011; NOGUEIRA, 2012).

Os óleos essenciais são substâncias voláteis que possuem várias funções dentro das plantas como por exemplo proteção contra predadores, perda de água, além da atividade antimicrobiana. Essas substâncias possuem capacidade de inibir o crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas incluindo microrganismos resistentes tais como *Staphylococcus aureus* MRSA, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus mutans* (LIMA et al., 2006; HASHEMI et al., 2013).

2.5. Antibióticos e conservantes químicos na cadeia produtiva de carnes

A busca por alternativas para atender a demanda de carnes pelo consumidor, necessitou a utilização de promotores de crescimento na dieta dos animais para caracterizar um processo de produção mais intensivo (SALMAN et al., 2006). Além disso, a preocupação para proteger esses alimentos perecíveis contra deterioração, exigiu a introdução de métodos de conservação que asseguram o tempo de prateleira desejado para esses tipos de alimentos (HOLLEY e PATEL, 2005).

2.5.1. Antibióticos como promotores de crescimento.

Define-se os antibióticos promotores de crescimento como agentes antibióticos empregados para elevar o ganho de massa diário ou a eficiência alimentar (taxa de aumento de massa em razão da alimentação) em animais de produção (WHO, 2002). Ou seja, trata-se de fármacos que matam ou inibem o crescimento bacteriano cuja administração é realizada em doses baixas e sub-terapêuticas (HUGHES e HERITAGE, 2002).

Além do aumento em tamanho, a inclusão dos antibióticos promotores de crescimento na nutrição animal em doses sub-terapêuticas, tem resultado no aumento da produção nas aves, aumento da taxa de filhotes por parto em suínos e aumento na produção de leite em vacas leiteiras (EDQVIST e PEDERSEN, 2001).

Entretanto, apesar das vantagens evidenciadas pela incorporação dos antibióticos na produção animal, a comunidade Europeia nos últimos anos tem mostrado sua posição contra a utilização destas substâncias em rações para animais monogástricos e ruminantes (MURAROLLI, 2008). Esta decisão se baseia no fato de que essas substâncias podem gerar riscos potenciais a saúde do consumidor tais como, o desenvolvimento de resistência bacteriana, alergia, efeitos teratogênicos, carcinogênicos e mutagênicos, razão pelo qual o seu uso vem sendo proibido (GÓRNIK e SPINOSA, 2007).

A legislação brasileira proíbe terminantemente o uso de alguns antibióticos como promotores de crescimento e mais recentemente, foi proibido

o uso dos antibióticos espiramicina e a eritromicina que se utilizavam na alimentação animal. Outros antibióticos como as tetraciclinas, sulfanamidas sistêmicas, cloranfenicol, avoparcina, nitrofurazona já tinham sido proibidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) nas portarias anteriores publicadas (BRASIL, 2012).

Existem muitas controvérsias sobre o custo-benefício do uso de antibióticos como promotores de crescimento em animais, sendo pertinente o desenvolvimento de formas que compensam as perdas de produtividade devido a retirada dessas substâncias da dieta dos animais. Uma das alternativas se baseia na introdução de novos aditivos alimentares que são eficazes em maximizar o efeito terapêutico em animais, além de minimizar os riscos relacionados aos antibióticos comumente usados como promotores de crescimento (LANGHOUT, 2005; SANTANA et al., 2011).

2.5.2. Conservantes químicos na produção de carnes.

Segundo a Portaria nº 540 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, define-se os aditivos conservadores de alimentos como substâncias que bloqueiam ou retardam os microrganismos ou enzimas que alteram a integridade dos alimentos (BRASIL, 1997).

Em diversos países, os aditivos conservadores de alimentos são amplamente utilizados para exercer várias funções no produto final. Entretanto, a sua incorporação em alimentos é regulada por legislações e critérios específicos que se baseiam a partir das recomendações da Organização Mundial de Saúde (CUNHA, 2003).

Com a finalidade de evitar a deterioração de produtos cárneos por microrganismos patogênicos, melhorar a aparência e aceitabilidade, além de aumentar o tempo de prateleira dos mesmos, conservantes químicos de tipo; nitritos e nitratos, sulfitos, parabenos e seus ésteres, são frequentemente utilizados (JIMÉNEZ-COLMENERO & SOLANA, 2009).

De acordo com Pardi et al. (2001), os nitratos incorporados em carnes são inicialmente reduzidos a nitrito por enzimas bacterianas presentes nesses

alimentos. Quando ingerido em excesso pelo consumidor, o nitrito apresenta risco de toxicidade aguda por ser capaz de se complexar irreversivelmente com a mioglobina do sangue formando metahemoglobina que é uma substância química que impede o transporte do oxigênio pelo organismo (HUIDOBRO et al., 2005).

Os riscos associados a incorporação de sulfito em alimentos se referem aos seus efeitos carcinogênicos e mutagênicos além de degradar a tiamina (Vitamina B₁) encontrado ricamente em carnes. Ainda, os estudos clínicos associam a presença de sulfitos em alimentos com as reações alérgicas e com os sintomas de intolerância alimentar em certos indivíduos (LEDERER, 1991; FENNEMA, 1993).

Segundo Lederer (1991), o uso dos sulfitos e seus derivados em carnes é proibido tanto no Brasil quanto nos Estados Unidos devido ao fato de suprimir maus odores além de converter da cor cinza-esverdeada para vermelho viva através de reações químicas, o que proporciona um aspecto atraente da carne para o consumidor. Em certos produtos cárneos tais como a linguiça, a Comunidade Europeia permite a quantidade máxima de sulfitos e seus derivados de 450 mg kg⁻¹ tendo os valores de IDA (Ingestão Diária Aceitável) de 0,7 mg kg⁻¹ por massa corpórea. (FAO/WHO, 1974).

Os valores de IDA (Ingestão Diária Aceitável) permitidos são 25mg kg⁻¹ e 5mg kg⁻¹ por massa corpórea para o ácido sórbico e ácido benzoico respectivamente. A Autoridade Europeia para Segurança de Alimento (EFSA), estabeleceu os valores de IDA de 10mg kg⁻¹ por massa corpórea para os parabens, seus ésteres e seus sais de sódio. No Brasil, a Secretaria de Vigilância Sanitária através da Portaria Nº 1.004 11/12/1998 estipulou os valores de 20mg/100g do mesmo índice em relação aos sorbatos (FAO/WHO, 1974; BRASIL, 1998; EC 2006).

2.6. Microrganismos e doenças transmitidas por produtos cárneos

A principal razão que explica o rápido crescimento de bactérias patogênicas e deterioradores em carne é a sua composição nutricional que é caracterizada por uma elevada atividade de água, grande quantidade de substâncias nitrogenadas, minerais além do pH (de 5,1 a 6,2) que favorece a

sobrevivência e proliferação desses microrganismos encontrados na sua superfície (FRANCO e LANDGRAF, 2008). Quando estas condições não são controladas adequadamente, podem causar doenças transmitidas por alimentos, resultando em prejuízos tanto econômicos quanto a saúde (Da SILVA et al., 2009).

2.6.1. Microrganismos patogênicos de carnes.

2.6.1.1. *Escherichia coli*.

A *Escherichia coli* é uma bactéria da família *Enterobacteriaceae*, sendo descrito como pequenos bacilos Gram-negativo, catalase-positivos, oxidase-negativos, aeróbios e anaeróbios facultativos. Segundo International Commission on Microbiological Specifications for Foods- ICMSF (1998), grande parte das suas cepas fermenta lactose, salvo alguns que são consideradas fermentadoras lentas e outras anaerogênicas.

As cepas patogênicas da *Escherichia coli* são classificadas em seis grupos: *E. coli* enteropatogênica clássica (EPEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAaggEC) e *E. coli* difusamente aderente (DAEC) (GERMANO e GERMANO, 2001). Essas cepas podem causar sintomas tais como dores abdominais, diarreia do tipo aquosa e sanguinolenta além dos vômitos enquanto em alguns casos, a síndrome urêmica hemolítica e a trombocitopenia púrpura podem se manifestar (PRAGER et al., 2005; MANNING et al., 2007).

Devido a sua alta prevalência no trato gastrointestinal dos animais de sangue quente, esta espécie é utilizada como indicador preferido para detectar e avaliar a contaminação fecal em alimentos e água para consumo. Além disso, pode ser usado como indicador das condições de higiene dos processos de manipulação dos alimentos, pois é capaz de se tornar parte da microbiota residente encontrada nas superfícies que entram em contato com os alimentos (SILVA et al., 2010).

O estudo feito por MOHAMMED (2012), mostra um aumento da presença de *E.coli* patogênica em produtos cárneos assim ressaltando o risco real em relação ao consumo de alimentos contaminados.

2.6.1.2. *Salmonella* spp.

O gênero *Salmonella* é derivada a partir da família *Enterobacteriaceae* e são descritos como bacilos Gram-negativos não formadores de esporos, de superfície lisa, catalase-positivos e oxidase-negativos. São de caráter anaeróbico facultativo, normalmente móveis por possuir flagelos peritríquios, produzem gás a partir da glicose (exceto *S.typhi*) além de serem capazes de obter o carbono a partir da sua única fonte; citrato (VARNAM, 1991; HOLT et al., 1994).

O trato gastrointestinal dos humanos e animais é o principal habitat do gênero *Salmonella*, podendo causar doenças que são normalmente divididas em três categorias: a febre tifoide, provocada por *Salmonella Typhi*; febres entéricas, provocadas por *Salmonella Paratyphi* e as enterocolites (salmoneloses), provocadas pelos demais cepas do gênero (SILVA et al., 2010). Os sintomas que acompanham essas doenças incluem a septicemia, febre, diarreia, vômitos e dores abdominais extensas, sendo mais ampla os sintomas da febre entérica em relação a febre tifoide (GERMANO e GERMANO, 2001; FRANCO e LANDGRAF, 2007).

Segundo Forsythe (2002) e Jay (2005), todas as espécies de *Salmonella* são patogênicas ao homem. O World Health Organization - WHO (2005), afirma que em várias áreas geográficas do mundo, o principal agente associado as doenças de origem alimentar é a bactéria *Salmonella* spp. No Brasil, este patógeno é responsável pelo maior número de surtos originados ao consumo de alimentos contaminados (BRASIL, 2010).

O consumo de carnes e produtos derivados que são contaminados com esta bactéria, tem contribuído imensamente com o aumento de surtos relatados (HUMPHREY e JORGENSEN, 2006). Ainda, diversos estudos mostram o aumento da resistência das cepas deste gênero frente aos agentes antimicrobianos, caracterizando uma grande dificuldade de tratamento de infecções relacionados além de ser um imenso risco para saúde pública (PEREZ-MONTANO et al., 2012).

2.6.1.3. Listeria monocytogenes.

As bactérias do gênero *Listeria* são bastonetes Gram-positivas, não esporulados, anaeróbios facultativos, móveis a temperatura de 10 a 25°C, tendo melhor faixa de pH para crescimento entre 6 a 8 que pode variar conforme a temperatura de incubação, atividade de água, perfil dos nutrientes entre outras variáveis (JAY, 2005).

O gênero *Listeria* compreende seis espécies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri* e *L. grayi*. Destas, apenas *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* são consideradas patogênicas, sendo a primeira acometendo humanos e animais e a segunda relacionada com doenças em ruminantes (ROCOURT e BUCHRIESER, 2007).

Segundo o Food and Drug Administration – FDA (2012), *L. monocytogenes* é uma bactéria que possui, até no momento, treze sorotipos: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e e 7. Porém, os sorotipos que são frequentemente associados as doenças em humanos são 1/2a, 1/2b e 4b.

As características de crescimento e sobrevivência desta espécie são influenciadas por vários fatores. Nos alimentos, a sua multiplicação depende de fatores como a temperatura, atividade de água, sal e a presença dos conservantes. A faixa de temperatura para crescimento de *L. monocytogenes* está entre -1,5 e 45°C, com a temperatura ótima de 30 a 37°C e temperaturas letais maiores que 50°C. O processo de congelamento pode reduzir o crescimento desta espécie que é capaz de se multiplicar em temperaturas de 0°C (LADO e YOUSEF, 2007).

A listeriose é a doença causada pela *Listeria monocytogenes* e pode causar complicações severas de saúde em determinados grupos da população. Em mulheres grávidas, esta doença pode resultar em abortos, além de ser fatal em indivíduos imunocomprometidos e idosos. Em pessoas saudáveis, a listeriose geralmente causa uma forma branda da doença (FARBER e PETERKIN, 1991).

A transmissão de *Listeria* spp através de alimentos contaminados é um dos meios mais prováveis e importantes, devido ao fato deste patógeno ter sido isolado em diferentes produtos alimentícios que incluem carne bovina, carne moída de diferentes animais, produtos cárneos crus, leite e seus derivados. Esta bactéria já foi isolada em utensílios encontrados em plantas envolvidas no processamento e manipulação da carne bovina (FRANCO e LANDGRAF, 2007; KOVACEVIC et al., 2012).

Ingham et al. (2004), mostram que este patógeno tem sido responsável por grande número de doenças de origem alimentar no mundo inteiro, sendo culpados os alimentos “prontos para consumo”, os quais, principalmente os produtos cárneos, são armazenados por longo períodos propiciando o crescimento deste patógeno.

A *Listeria monocytogenes* representa um grave problema na saúde pública devido a existência de sorotipos patogênicos e resistentes aos principais agentes antimicrobianos empregados para tratar a listeriose, assim tornando difícil o controle deste microrganismo (MANTILLA et al., 2008).

2.7. Impacto na saúde pública dos antibióticos e conservantes químicos usados na cadeia produtiva de carnes.

O consumo de alimentos de origem animal constitui a principal rota de contaminação e transmissão de bactérias e genes resistentes encontrados nos animais de produção e que são transferidos para os seres humanos (WHO, 2011).

A Organização Europeia de Consumidores - BEUC (2014), pesquisou a presença de bactérias resistentes aos antimicrobianos em produtos cárneos comprados em diferentes estabelecimentos de comércio e evidenciou a prevalência de bactérias resistentes, tais como *Staphylococcus aureus* resistente a metilcolina (MRSA) e *Campylobacter* resistente.

Por outro lado, a maioria dos antibióticos administrados em animais não sofrem uma metabolização completa, sendo excretados na urina e nas fezes como composto original ou como composto parcialmente metabolizado

(KEMPER, 2008). A utilização desses excretos animais como adubos, constitui uma das importantes vias de disseminação dos resíduos de antibióticos no ambiente. Essas substâncias podem se acumular no solo, em tecidos vegetais, passar por lixiviação ou até se acumular em corpos hídricos, influenciando no aumento da resistência patogênica aos agentes antibióticos tanto em humanos como em animais (BOXALL et al., 2006; KEMPER, 2008).

Quando se trata dos riscos para saúde pública associados ao uso de conservantes químicos em produtos cárneos, o estudo feito por Sugimura e Wakabayashi (2003), mostra as reações adversas do tipo aguda ou crônica tais como as reações metabólicas tóxicas resultando em alergias, alteração em comportamento, além do efeito carcinogênico destes aditivos.

Portanto, há uma grande necessidade para conter o impacto dessas substâncias na saúde pública, através da adoção de medidas que regulam a utilização de antibióticos na medicina veterinária além de realizar novas pesquisas para encontrar melhores soluções de combater e diminuir os riscos associados ao uso dos conservantes químicos em produtos cárneos (BEUC, 2014).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos dos frutos do Pantanal: *Byrsonima cydoniifolia* A. Juss. (canjiqueira), *Pouteria glomerata* (Miq.) Radlk. (laranjinha de pacu) e *Vitex cymosa* Bert. (tarumã).

3.2. Objetivos específicos

- Realizar o teste de difusão em disco dos extratos da casca com polpa e semente de cada fruto verde e maduro
- Realizar o antibiograma das cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes*
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração microbicida mínima (CMM) de cada extrato de casca com polpa e semente de cada fruto verde e maduro

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Coleta dos frutos

Os frutos de canjiqueira, laranjinha de pacu e tarumã foram adquiridos em diferentes localidades da região do Pantanal do estado de Mato Grosso do Sul no Brasil. Frutos de canjiqueira foram coletados em Passo da Lontra (19°34'13,33"S e 57°01'11,20"W), no município de Corumbá no mês de março de 2014, enquanto os frutos de laranjinha de pacu foram coletados em Porto da Manga (19°14'04,00"S e 57°14'41,8"W), no município de Corumbá no mês de junho de 2014. Quanto ao fruto de tarumã, a coleta foi feita no bairro Carandá Bosque (20°37'26,00"S e 54°29'34,00"W), no município de Campo Grande no mês de março de 2014.

As exsiccatas do material botânico coletado foram identificadas pela Profa. Dra. Vali J Pott da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS) e o material testemunho se encontra depositado no herbário da UFMS sob registro nº; 42573, 43424 e 42645 para os frutos de canjiqueira, laranjinha de pacu e tarumã, respectivamente.

4.2. Processamento dos frutos

O processamento dos frutos foi realizado nos laboratórios da Unidade de Tecnologia de Alimentos e Saúde Pública no campus da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul/Campo Grande.

Os frutos coletados foram selecionados, lavados com água corrente e secos dentro da capela biológica previamente assepsiada. Em seguida, os frutos foram fracionados em casca com polpa e semente, sendo que a casca com polpa foi triturada em liquidificador comum (Arno®) antes de serem utilizados para obtenção do extrato etanólico dos mesmos. As sementes foram secas em estufa de circulação de ar forçada, a 40°C e após a secagem foram homogeneizadas e reduzidas a partículas pequenas utilizando o triturador do tipo turrax (Turrac TE-102 Tecnal).

4.3. Preparo dos extratos hidroalcoólicos

Para a obtenção dos extratos hidroalcoólicos dos frutos, foi utilizada a metodologia de acordo com a Farmacopéia Brasileira (2010) e adaptações de Virtuoso et al. (2005).

O material resultante da moagem de cada parte do fruto foi pesado separadamente em erlenmeyer nas quantidades de 20g e 30g em balança semi-analítica (BL 3200H) e adicionou-se solução hidroalcoólica a 70%, obtendo a proporção de 20% e 30% ($m v^{-1}$) dos extratos. Essas soluções foram submetidas ao processo de maceração durante um período de 25 dias, sendo estocadas à temperatura ambiente e envoltas por papel laminado para ficarem protegidas da luz. Em seguida, foi realizado a filtragem do conteúdo usando papel de filtro qualitativo com porosidade de 3 micras (Nalgon).

As soluções filtradas foram concentradas com auxílio do evaporador rotativo a vácuo (Rotoevaporador R-3, Buchi) na temperatura de 40° C para eliminar todo o solvente. Em cada evaporado final obtido foram adicionados 20 mL de etanol PA 99,5%, correspondente a cada parte do fruto estudado em concentrações de 20 e 30%.

4.4. Obtenção das cepas

Foram utilizados microrganismos de referência rastreáveis a American Type Culture Collection (ATCC) do tipo: *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes*, fornecidos pelo INCQS/FIOCRUZ (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, sediada no Rio de Janeiro) para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos, da Unidade de Tecnologia de Alimentos e Saúde Pública da UFMS/ Campo Grande MS.

4.5. Preparo dos meios de cultura

Os meios de culturas foram preparados segundo o manual do fabricante, foram pesadas em balança semi-analítica (BL 3200H); 14,4 g de ágar Mueller-Hinton (HIMEDIA) e 8,4 g de caldo Mueller-Hinton (HIMEDIA) e solubilizados em erlenmeyers contendo 400 mL de água destilada respectivamente. Em seguida, os meios foram submetidos ao processo de esterilização por autoclavagem a 121°C por 15 minutos (HIMEDIA, 2011).

4.6. Preparo do inóculo bacteriano

Para a obtenção do inóculo bacteriano, foi utilizada a metodologia descrita no Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2003). Foram selecionadas 2 a 3 colônias das três bactérias isoladas em ágar Mueller-Hinton e diluídas em tubos de ensaio contendo 10 mL de solução fisiológica 0,85% (p v⁻¹), obtendo uma turvação equivalente ao padrão 0,5 da escala de Mac Farland (Probac do Brasil) o que corresponde aproximadamente a $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹.

Em seguida, uma alíquota de 0,1 mL dessa suspensão foi semeada em placas de petri contendo ágar Mueller-Hinton, para realizar a quantificação dos microrganismos presentes nos inóculos utilizando o processo de plaqueamento em profundidade em meio para contagem padrão das bactérias.

As placas foram incubadas em estufa a 37°C/24 horas e logo após a incubação, foi feita a contagem das bactérias presentes; *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes* e os resultados expressos em UFC mL⁻¹.

4.7. Ensaio de difusão de disco

A avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos baseou-se no método de difusão em disco descrita por Bauer et al. (1966) e adaptações por Karaman et al. (2003), utilizando discos de papel de filtro estéreis com 6 mm de diâmetro (CECON – SP).

Os discos de papel de filtro foram impregnados com 0,1 mL dos extratos hidroalcoólicos brutos (45 mg mL⁻¹) de cada parte do fruto e mantidos em capela de exaustão de fluxo laminar para a secagem. Posteriormente, os mesmos foram distribuídos sobre as placas de petri contendo ágar Mueller-Hinton previamente inoculado com as bactérias por espalhamento em superfície, obedecendo uma distância entre os discos para evitar interferências entre os possíveis halos de inibição (GONÇALVES et al., 2005).

Utilizou-se como controle negativo discos de papel filtro estéreis e como controle positivo, discos de papel filtro (CECON-SP) do antibiótico azitromicina 15 µg e em seguida, as placas foram incubadas a 37°C/24 horas.

4.7.1. Antibiograma das cepas

Foi realizado um antibiograma das cepas usando os discos do papel filtro dos antibióticos; azitromicina 15 µg, vancomicina 30 µg, gentamicina 10 µg, tetraciclina 30 µg, penicilina 10U e cloranfenicol 30 µg para posterior comparação entre os halos de inibição formados, sendo medidos os diâmetros dos halos de inibição utilizando um paquímetro (Western® PRO).

4.7.2. Análises estatísticas

Foram consideradas as médias e os respectivos desvio padrão dos halos de inibição de cada teste que foi feito em triplicata, sendo interpretado como sensível halo igual ou acima de 8 mm (≥ 8 mm) de diâmetro (DANTAS et al., 2010).

Os resultados foram apresentados com auxílio do programa de estatística GraphPad Prism® versão 5.01 utilizando o teste de variância de dois fatores (2 way ANOVA) e seguido por teste *post hoc* de Bonferroni (Bonferroni Post-Test) com nível de 5% de significância ($p < 0,05$) (SIQUEIRA, 2012). Ainda para o antibiograma, as médias dos diâmetros dos halos de inibição dos antibióticos foram comparadas entre si, para identificar o antibiótico mais eficiente contra as três cepas selecionadas.

4.8. Determinação da Concentração Inibitória Mínima dos extratos

A técnica de diluição em microplacas (96 orifícios) foi usada para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de acordo com a metodologia descrita segundo as normas do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2006). A CIM é a menor concentração da substância sob estudo capaz de inibir o crescimento de 90% dos microrganismos (GOLDMAN e AUSIELLO, 2009).

Os orifícios das microplacas foram preenchidos com 0,1 mL de caldo Mueller-Hinton e em seguida foram acrescentados 0,1 mL dos extratos das partes dos frutos e realizada a diluição seriada de 1:1 até 1:64. Adicionalmente, foram distribuídos 0,01 mL das suspensões dos microrganismos em cada orifício das microplacas exceto nos orifícios destinados para o controle negativo.

Foram realizados os testes para o controle negativo (somente o caldo Mueller-Hinton) e controle positivo sendo 0,1 mL de azitromicina 15 µg, preparado segundo as normas descritas no Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2013) para este antibiótico.

As microplacas foram incubadas em estufa 37°C/24 horas para os três microrganismos testados, sendo que cada conteúdo dos orifícios da microplaca foi testado em duplicata e o mesmo teste repetido três vezes nas semanas consecutivas. Finalmente, os valores representativos de CIM foram categorizados segundo a classificação de Aligiannis et al. (2001) e Webster et al. (2008).

4.8.1. Leitura com revelador

O revelador resazurina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi utilizado para realizar a leitura acrescentando 0,03 mL em cada orifício da microplaca contendo as bactérias. Ao longo de 2 horas, se for observado a coloração azul significa ausência de crescimento bacteriano, enquanto a coloração rosa representa a presença de crescimento bacteriano (PALOMINO et al., 2002).

Segundo Fukushima et al. (2003), o uso da resazurina é mais indicado em condições de redução em meios de cultura, tendo o seu mecanismo baseado na redução da resazurina (cor púrpura) em resarufina (cor rósea), como ilustrado na Figura 4. Além disso, o seu mecanismo de ação é diretamente correlacionado com a quantidade/proliferação de organismos tais como bactérias e até células de mamíferos (O'BRIEN et al., 2000).

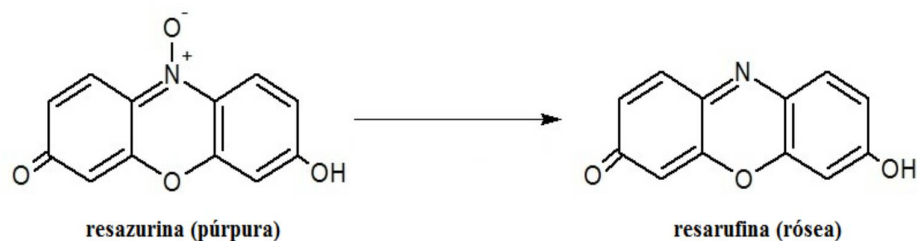


Figura 4: Reação de oxirredução da resazurina (Fonte: ROZATTO, 2012).

4.9. Determinação da Concentração Microbicida Mínima (CMM) dos extratos

Foi realizado o teste para CMM dos extratos após a determinação da CIM dos mesmos, utilizando as placas de Petri contendo ágar Mueller-Hinton. A partir das amostras que não apresentaram crescimento do inóculo em relação a CIM, foram retiradas alíquotas de 0,01 mL dos orifícios e plaqueadas sobre o ágar Mueller-Hinton, sendo incubadas em seguida a 37°C por 24 horas. Foi considerada a CMM, a menor concentração do extrato em que não apresentou crescimento celular sobre a superfície do ágar Mueller-Hinton (POZZO et al., 2011).

5. RESULTADOS

5.1. Teste de difusão de disco

Os resultados referentes ao teste de difusão em disco dos extratos hidroalcoólicos dos frutos *Byrsonima cydoniifolia* A. Juss. (canjiqueira), com os microrganismos *Escherichia coli*, *Salmonella spp* e *Listeria monocytogenes* estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Diâmetros dos halos de inibição do crescimento microbiano pelo teste de difusão em disco utilizando extrato hidroalcoólico de *Byrsonima cydoniifolia* A. Juss.

| Extratos | Microrganismos | | |
|-----------------------------|----------------|-----------------------|-------------------------------|
| | <i>E.coli</i> | <i>Salmonella spp</i> | <i>Listeria monocytogenes</i> |
| Casca + Polpa Verde | | | |
| Extrato a 20% | 6,00 ± 0,00 | 6,00 ± 0,00 | 8,67 ± 2,08 ^A |
| Extrato a 30% | 6,33 ± 0,29 | 6,00 ± 0,00 | 6,33 ± 0,28 |
| Casca + Polpa Madura | | | |
| Extrato 20% | 6,00 ± 0,00 | 6,67 ± 0,58 | 12,67 ± 0,33 ^{Ba} |
| Extrato a 30% | 8,00 ± 1,00 | 6,00 ± 0,00 | 8,33 ± 1,20 ^b |
| Semente Verde | | | |
| Extrato a 20% | 6,00 ± 0,00 | 6,00 ± 0,00 | 19,00 ± 1,00 ^{Cc} |
| Extrato a 30% | 6,00 ± 0,00 | 6,33 ± 0,58 | 8,00 ± 1,00 ^{Ed} |
| Semente Madura | | | |
| Extrato a 20% | 6,00 ± 0,00 | 6,00 ± 0,00 | 6,00 ± 0,00 ^{De} |
| Extrato a 30% | 6,17 ± 0,29 | 6,00 ± 0,00 | 11,67 ± 0,58 ^{Ff} |

Nota: Média das triplicatas dos halos de inibição em milímetros (mm) ± desvio padrão. Letras maiúsculas sobrescritas mostram diferença significativa entre as partes maduras e verdes de mesma proporção. Letras minúsculas sobrescritas mostram diferença significativa entre proporções diferentes do mesmo grupo. ANOVA seguido por Bonferroni, (p< 0,05).

A Tabela 2 apresenta os resultados do teste de difusão em disco dos extratos hidroalcoólicos dos frutos *Pouteria glomerata* (Miq.) Radlk. (Laranjinha de pacu), com os microrganismos *Escherichia coli*, *Salmonella spp* e *Listeria monocytogenes*.

Tabela 2 - Diâmetros dos halos de inibição do crescimento microbiano pelo teste de difusão em disco utilizando extrato hidroalcoólico de *Pouteria glomerata* (Miq.) Radlk.

| Extratos | Microrganismos | | |
|-----------------------------|----------------|-----------------------|-------------------------------|
| | <i>E.coli</i> | <i>Salmonella spp</i> | <i>Listeria monocytogenes</i> |
| Casca + Polpa Verde | | | |
| Extrato a 20% | 6,00 ± 0,00 | 6,00 ± 0,00 | 10,00 ± 1,00 ^a |
| Extrato a 30% | 6,00 ± 0,00 | 6,00 ± 0,00 | 6,00 ± 0,00 ^{Ab} |
| Casca + Polpa Madura | | | |
| Extrato 20% | 6,17 ± 0,29 | 6,00 ± 0,00 | 12,00 ± 1,00 |
| Extrato a 30% | 6,83 ± 0,29 | 6,00 ± 0,00 | 13,33 ± 2,08 ^B |
| Semente Verde | | | |
| Extrato a 20% | 6,00 ± 0,00 | 6,00 ± 0,00 | 6,00 ± 0,00 |
| Extrato a 30% | 6,00 ± 0,00 | 6,00 ± 0,00 | 6,00 ± 0,00 |
| Semente Madura | | | |
| Extrato a 20% | 6,00 ± 0,00 | 7,00 ± 0,00 | 6,00 ± 0,00 |
| Extrato a 30% | 6,00 ± 0,00 | 6,00 ± 0,00 | 6,00 ± 0,00 |

Nota: Média das triplicatas dos halos de inibição em milímetros (mm) ± desvio padrão. Letras maiúsculas sobrescritas mostram diferença significativa entre as partes maduras e verdes de mesma proporção. Letras minúsculas sobrescritas mostram diferença significativa entre proporções diferentes do mesmo grupo. ANOVA seguido por Bonferroni, (p< 0,05).

Os resultados do teste de difusão em disco dos extratos hidroalcoólicos dos frutos *Vitex cymosa* Bert. (Tarumã), com os microrganismos *Escherichia coli*, *Salmonella spp* e *Listeria monocytogenes* estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Diâmetros dos halos de inibição do crescimento microbiano pelo teste de difusão em disco utilizando extrato hidroalcóolico de *Vitex cymosa* Bert.

| Extratos | Microrganismos | | |
|-----------------------------|----------------|-----------------------|-------------------------------|
| | <i>E.coli</i> | <i>Salmonella spp</i> | <i>Listeria monocytogenes</i> |
| Casca + Polpa Verde | | | |
| Extrato a 20% | 6,00 ± 0,00 | 6,67 ± 0,58 | 7,13 ± 0,80 ^a |
| Extrato a 30% | 6,00 ± 0,00 | 6,00 ± 0,00 | 9,17 ± 0,76 ^{Ab} |
| Casca + Polpa Madura | | | |
| Extrato 20% | 6,00 ± 0,00 | 6,33 ± 0,58 | 6,00 ± 0,00 |
| Extrato a 30% | 6,00 ± 0,00 | 7,00 ± 0,00 | 6,00 ± 0,00 ^B |
| Semente Verde | | | |
| Extrato a 20% | 6,33 ± 0,58 | 6,00 ± 0,00 | 7,00 ± 0,00 ^C |
| Extrato a 30% | 6,17 ± 0,29 | 6,33 ± 0,58 | 7,20 ± 0,20 |
| Semente Madura | | | |
| Extrato a 20% | 6,00 ± 0,00 | 6,00 ± 0,00 | 8,30 ± 0,26 ^{Dc} |
| Extrato a 30% | 6,17 ± 0,29 | 7,00 ± 0,00 | 11,00 ± 0,00 ^d |

Nota: Média das triplicatas dos halos de inibição em milímetros (mm) ± desvio padrão. Letras maiúsculas sobrescritas mostram diferença significativa entre as partes maduras e verdes de mesma proporção. Letras minúsculas sobrescritas mostram diferença significativa entre proporções diferentes do mesmo grupo. ANOVA seguido por Bonferroni, (p< 0,05).

5.1.1. Antibiograma das cepas

Em todos os testes, o controle positivo, azitromicina 15 µg, mostrou-se eficiente frente as três cepas testadas, apresentando halos de inibição que variam entre 13 a 35 mm de diâmetro como ilustrado na Tabela 4. Ainda, foi constatado uma diferença significativa (p<0,05) ao comparar os halos do controle positivo com os halos dos antibióticos selecionados exceto o cloranfenicol 15 µg, contra a *Listeria monocytogenes*, como mostra a Figura 5. Esta diferença significativa (p<0,05) foi apresentado por meio do teste de variância de dois fatores (2 way ANOVA) e seguido por teste *post hoc* de Bonferroni (Bonferroni Post-Test) (SIQUEIRA, 2012).

Tabela 4 - Média dos diâmetros, dos halos de inibição do crescimento microbiano no antibiograma das cepas.

| Antimicrobianos | Microrganismos | | |
|--------------------|----------------|-----------------------|-------------------------------|
| | <i>E.coli</i> | <i>Salmonella</i> spp | <i>Listeria monocytogenes</i> |
| Azitromicina 15µg | 13,33 ± 1,15 | 14,00 ± 1,00 | 35,00 ± 1,00 |
| Vancomicina 30µg | 6,00 ± 0,00 | 6,00 ± 0,00 | 16,00 ± 2,00 |
| Gentamicina 10µg | 14,00 ± 1,00 | 12,67 ± 1,16 | 6,00 ± 0,00 |
| Tetraciclina 30µg | 8,67 ± 1,15 | 11,0 ± 1,00 | 12,00 ± 2,00 |
| Penicilina G 10U | 7,00 ± 1,00 | 6,33 ± 0,57 | 13,00 ± 1,00 |
| Cloranfenicol 15µg | 7,00 ± 0,00 | 15,67 ± 0,57 | 32,67 ± 3,05 |

Nota: Média das triplicatas dos halos de inibição em milímetros (mm). Os valores representam a média ± desvio padrão

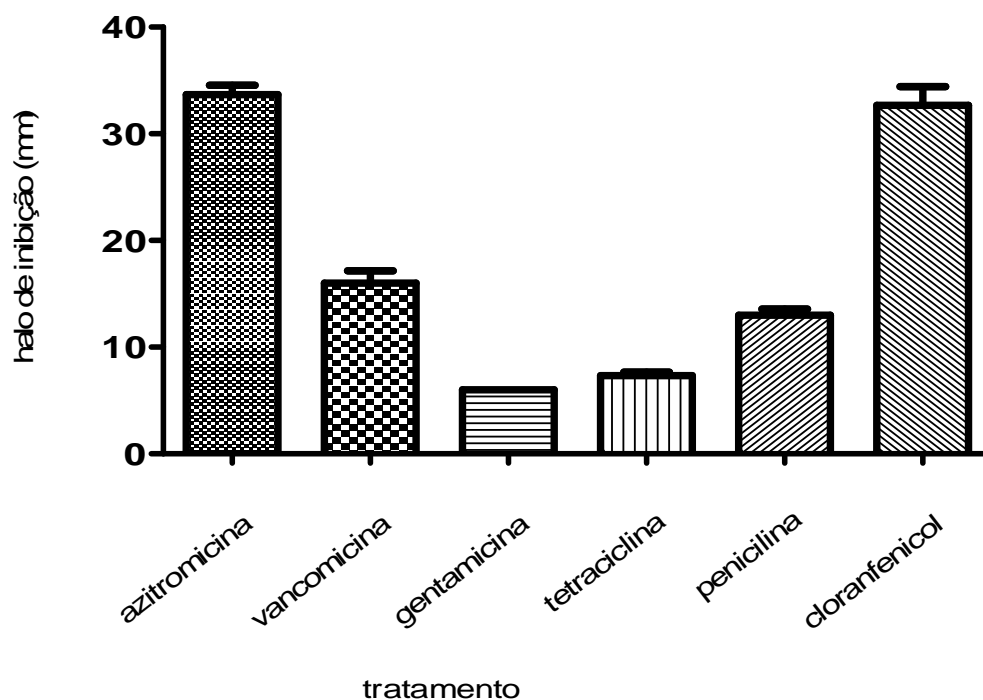


Figura 5. Antibiograma mostrando a diferença de diâmetro entre os halos de inibição do controle positivo e dos antibióticos selecionados contra a *Listeria monocytogenes*. Os valores representam a média ± desvio padrão.

5.1.2. Comparação da atividade inibitória dos frutos contra os microrganismos

Em relação ao fruto *Byrsonima cydoniifolia* A. Juss, somente o extrato a 30% da casca+polpa madura apresentou halo de inibição sensível (≥ 8 mm) frente as cepas de *E.coli*. Nenhum dos extratos testados contra a *Salmonella* spp apresentaram halos de inibição sensíveis. Porém, com exceção dos extratos a 20% da semente madura e a 30% da casca+polpa verde, os outros extratos em suas respectivas concentrações produziram halos de inibição sensíveis, contra o microrganismo *Listeria monocytogenes* como consta na Tabela 1.

Observou-se uma diferença significativa entre halos de inibição dos extratos de *Byrsonima cydoniifolia* A. Juss, frente ao microrganismo *Listeria monocytogenes*, como mostra a Tabela 1. Ainda, os extratos a 20% produziram halos maiores contra *Listeria monocytogenes*, do que os extratos a 30% dos mesmos grupos exceto o grupo de semente madura.

Os extratos das partes do fruto *Pouteria glomerata* (Miq.) Radlk, não produziram halos de inibição sensíveis frente aos microrganismos *E.coli* e *Salmonella* spp. Entretanto, segundo a Tabela 2, os extratos a 20% da casca+polpa verde e os extratos a 20% e 30% da casca+polpa madura, apresentaram halos de inibição sensíveis contra o microrganismo *Listeria monocytogenes*.

De acordo com a Tabela 2, houve uma diferença significativa entre os halos de inibição dos extratos de *Pouteria glomerata* (Miq.) Radlk, contra a *Listeria monocytogenes*, onde os halos de inibição da casca+polpa madura foram maiores que os halos da casca+polpa verde do mesmo fruto.

O fruto de *Vitex cymosa* Bert, não apresentou halos de inibição sensíveis frente aos microrganismos *E.coli* e *Salmonella* spp como mostra a Tabela 3, porém, foram produzidos halos de inibição sensíveis contra o microrganismo *Listeria monocytogenes*, pelos os extratos a 30% casca+polpa verde, 20% e 30% semente madura, respectivamente.

Segundo a Tabela 3, foi observado uma diferença significativa entre os halos de inibição dos extratos de *Vitex cymosa* Bert, frente a *Listeria monocytogenes*, mostrando que os extratos a 30% produziram halos de inibição maiores do que os extratos a 20% dos grupos; casca+polpa verde e semente verde.

Em comparação com os microrganismos *E.coli* e *Salmonella* spp, a *Listeria monocytogenes* apresentou maior sensibilidade, exibindo com mais frequência, halos de inibição maiores que 8 mm frente aos extratos dos frutos de *Byrsonima cydoniifolia* A. Juss, *Pouteria glomerata* (Miq.) Radlk e *Vitex cymosa* Bert.

5.2. Teste da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração microbicida mínima (CMM)

A atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos dos frutos *Byrsonima cydoniifolia* A. Juss. (canjiqueira), *Pouteria glomerata* (Miq.) Radlk. (Laranjinha de pacu) e *Vitex cymosa* Bert. (Tarumã) foi avaliada contra os microrganismos *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes* e os resultados apresentados nas Tabelas 5,6,7 e Figura 6. Assim, foi determinada a concentração inibitória mínima e a concentração microbicida mínima frente a cada microrganismo.

Tabela 5 – Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração microbicida mínima (CMM) em $\mu\text{g mL}^{-1}$, dos extratos de *Byrsonima cydoniifolia* A. Juss.

| | Microrganismos | | | | | |
|-----------------------------|----------------|-----|-----------------------|-----|-------------------------------|---------|
| | <i>E.coli</i> | | <i>Salmonella spp</i> | | <i>Listeria monocytogenes</i> | |
| | CIM | CMM | CIM | CMM | CIM | CMM |
| Casca + Polpa Verde | | | | | | |
| Extrato a 20% | - | X | 703,13 | X | - | 703,13 |
| Extrato a 30% | - | X | 703,13 | X | 703,13 | 1406,25 |
| Casca + Polpa Madura | | | | | | |
| Extrato 20% | - | X | - | X | - | X |
| Extrato a 30% | - | X | - | X | - | X |
| Semente Verde | | | | | | |
| Extrato a 20% | 703,13 | X | 703,13 | X | 703,13 | X |
| Extrato a 30% | 703,13 | X | 703,13 | X | 703,13 | X |
| Semente Madura | | | | | | |
| Extrato a 20% | 703,13 | X | 703,13 | X | 703,13 | X |
| Extrato a 30% | 703,13 | X | 703,13 | X | 703,13 | X |

Nota: (-) CIM > 1000 $\mu\text{g/mL}$; (x) sem CMM

Tabela 6 – Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração microbicida mínima (CMM) em $\mu\text{g mL}^{-1}$, dos extratos de *Pouteria glomerata* (Miq.) Radlk.

| | Microrganismos | | | | | |
|-----------------------------|----------------|-----|-----------------------|---------|-------------------------------|---------|
| | <i>E.coli</i> | | <i>Salmonella spp</i> | | <i>Listeria monocytogenes</i> | |
| | CIM | CMM | CIM | CMM | CIM | CMM |
| Casca + Polpa Verde | | | | | | |
| Extrato a 20% | - | X | - | X | - | 1406,25 |
| Extrato a 30% | - | X | - | X | - | 1406,25 |
| Casca + Polpa Madura | | | | | | |
| Extrato 20% | - | X | - | 1406,25 | - | X |
| Extrato a 30% | - | X | - | X | - | X |
| Semente Verde | | | | | | |
| Extrato a 20% | 703,13 | X | 703,13 | X | 703,13 | X |
| Extrato a 30% | 703,13 | X | 703,13 | X | 703,13 | X |
| Semente Madura | | | | | | |
| Extrato a 20% | 703,13 | X | 703,13 | X | 703,13 | X |
| Extrato a 30% | 703,13 | X | 703,13 | X | 703,13 | X |

Nota: (-) CIM > 1000 $\mu\text{g/mL}$; (x) sem CMM

Tabela 7 – Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração microbicida mínima (CMM) em $\mu\text{g mL}^{-1}$, dos extratos de *Vitex cymosa* Bert.

| | Microrganismos | | | | | |
|-----------------------------|----------------|-----|-----------------------|-----|-------------------------------|-----|
| | <i>E.coli</i> | | <i>Salmonella spp</i> | | <i>Listeria monocytogenes</i> | |
| | CIM | CMM | CIM | CMM | CIM | CMM |
| Casca + Polpa Verde | | | | | | |
| Extrato a 20% | 703,13 | X | - | X | 703,13 | X |
| Extrato a 30% | 703,13 | X | - | X | 703,13 | X |
| Casca + Polpa Madura | | | | | | |
| Extrato 20% | - | X | 703,13 | X | - | X |
| Extrato a 30% | - | X | 703,13 | X | - | X |
| Semente Verde | | | | | | |
| Extrato a 20% | 703,13 | X | - | X | 703,13 | X |
| Extrato a 30% | 703,13 | X | - | X | 703,13 | X |
| Semente Madura | | | | | | |
| Extrato a 20% | - | X | - | X | 703,13 | X |
| Extrato a 30% | - | X | - | X | 703,13 | X |

Nota: (-) CIM > 1000 $\mu\text{g/mL}$; (x) sem CMM

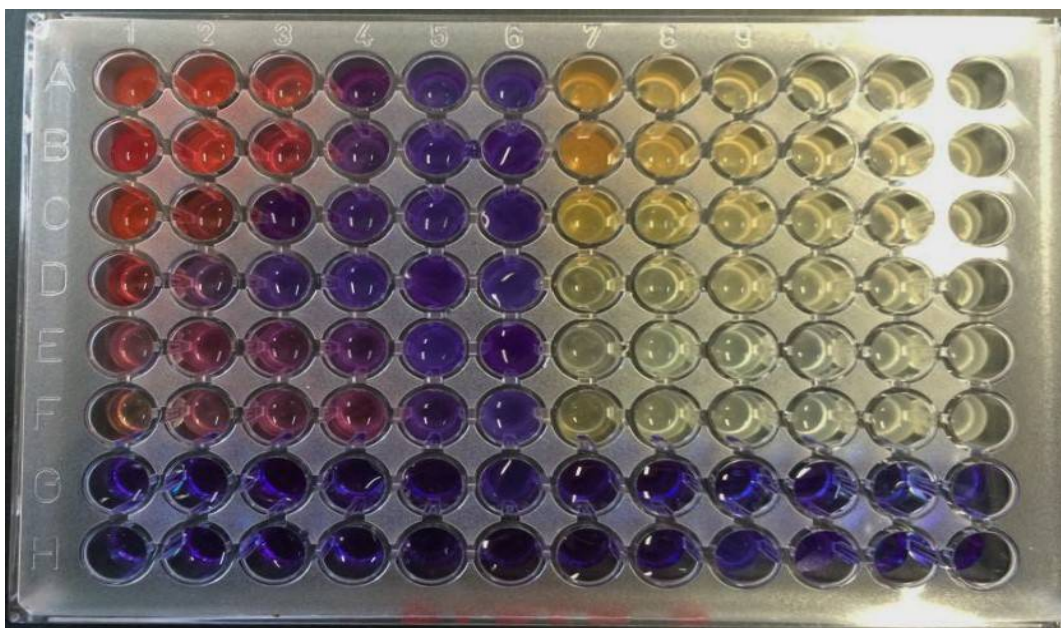


Figura 6 – Representação do ensaio revelado com resazurina a 0,01%.

Fonte: Denis Okoba, 2015.

5.2.1. Comparação dos valores de CIM e CMM contra os microrganismos

Em relação ao fruto de *Byrsonima cydoniifolia* A. Juss, os extratos da semente verde e madura tiveram atividade inibitória contra as cepas de *E.coli*, *Salmonella spp* e *Listeria monocytogenes*, apresentando valores de CIM menor que $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os extratos da casca+polpa verde e madura, somente não apresentaram valores de CIM menor que $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ frente as cepas de *E.coli*. Os valores de CMM foram registrados com os extratos da casca+polpa verde contra *Listeria monocytogenes* ($703,13 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $1406,25 \mu\text{g mL}^{-1}$) como mostra a Tabela 5.

Os extratos derivados da semente verde e madura do fruto de *Pouteria glomerata* (Miq.) Radlk, demonstraram ação inibitória contra os três microrganismos, com valores de CIM menores que $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ como mostrada na tabela 6. A CMM foi registrada pelos extratos da casca+polpa verde e madura contra a *Salmonella spp* e *Listeria monocytogenes*, com valores de $1406,25 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Segundo a Tabela 7, os extratos derivados das partes; casca com polpa verde e semente verde de *Vitex cymosa* Bert, nas concentrações testadas,

demonstraram atividade inibitória contra os microrganismos *E.coli* e *Listeria monocytogenes*. As partes, casca com polpa madura e semente madura do mesmo fruto, inibiram os microrganismos *Salmonella* spp e *Listeria monocytogenes*, com valores de CIM menor que $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Entretanto, não foram registrados valores de CMM neste teste contra os mesmos microrganismos.

Em relação a sensibilidade microbiana, a *Listeria monocytogenes* foi o microrganismo mais sensível, sendo inibida pela maioria dos extratos dos três frutos testados em comparação aos microrganismos *E.coli* e *Salmonella* spp que apresentaram uma sensibilidade menor.

Os valores de CMM foram registrados com mais frequência nos testes envolvendo os extratos de *Byrsonima cydoniifolia* A. Juss, e de *Pouteria glomerata* (Miq.) Radlk, contra os microrganismos do tipo *Listeria monocytogenes*. No presente estudo, não foram registrados valores de CMM contra o *E.coli* em todos os testes envolvendo os três frutos.

6. DISCUSSÃO

As plantas possuem diversos metabolitos secundários nas suas estruturas químicas que apresentam propriedades antimicrobianas contra os microrganismos que são transmitidos para o homem por meio do consumo dos alimentos de origem animal, principalmente as carnes (BUSATTA et al., 2008; CARRAMIÑANA et al., 2008).

Além disso, é possível que a atividade antimicrobiana observada no presente estudo, esteja relacionada aos metabolitos secundários contidos nos frutos do Pantanal selecionados. Esse fato, foi afirmado por Santos (2015), que estudou atividade antimicrobiana dos frutos de *Genipa americana* L. (jenipapo), *Dipteryx alata* Vog. (baru) e *Vitex cymosa* Bert. (tarumã) contra os microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* e relacionou esse potencial antimicrobiano à possível presença dos compostos bioativos.

No presente estudo, somente o extrato a 30% da casca+polpa madura de *Byrsonima cydoniifolia* A. Juss mostrou atividade com halo de inibição ($8,0 \pm 1,0$ mm) contra a *E.coli*, enquanto nenhum extrato foi ativo contra a *Salmonella* spp. A *Listeria monocytogenes* foi sensível frente a maioria dos extratos deste fruto. Esses resultados são semelhantes ao estudo com o extrato metanólico das folhas do gênero *Byrsonima* que apresentou halos de inibição (> 8 mm) frente a *E.coli* (PEREIRA, 2011), porém divergem de outra pesquisa que mostrou halos de inibição (> 9 mm) contra a *Salmonella* spp (MICHELIN et al., 2008).

Os extratos de *Pouteria glomerata* (Miq.) Radlk, demonstraram atividade inferior (halos < 8 mm) contra as cepas de *E.coli* e *Salmonella* spp, enquanto a *Listeria monocytogenes* foi sensível aos extratos desta espécie com halos de inibição de até 13 mm. Esses resultados mostram que essas bactérias Gram negativas não foram sensíveis a esses extratos nas concentrações testadas, sendo semelhante com os dados relatados com os extratos etanólicos de *Pouteria ramiflora* Radlk, *Pouteria torta* e *Pouteria venosa* (SILVA, 2013; SANTOS et al., 2014).

A espécie *Vitex cymosa* Bert, apresentou atividade inferior (halos < 8 mm) contra *E.coli* e *Salmonella* spp, porém os extratos da casca + polpa verde a 30% e semente madura, inibiram o crescimento da *Listeria monocytogenes*. A capacidade dos extratos desta espécie de inibir o crescimento desta bactéria Gram-positiva, foi semelhante a atividade inibitória apresentada pelo óleo essencial do fruto desta mesma espécie contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* MRSA, *Lactobacillus casei* e *Streptococcus mutans* mostrada por Fonseca et al.,2006.

A diferença significativa observada entre os halos de inibição dos extratos de cada fruto, sugeriu que a concentração do extrato, parte do fruto testado e o estágio da maturação do fruto, foram fatores importantes que provavelmente influenciaram na ação inibitória dos metabolitos secundários presentes contra os microrganismos selecionados.

Os resultados do presente estudo mostraram que entre os três microrganismos envolvidos; *E.coli*, *Salmonella* spp e *Listeria monocytogenes*, a bactéria Gram-positiva se mostrou mais sensível aos extratos testados, sugerindo que seja por causa da morfologia estrutural dessa bactéria. Segundo Tadeg et al. (2005), as bactérias Gram negativas, principalmente a *E.coli*, são citadas por apresentarem resistência contra muitos agentes antimicrobianos, assim como se mostraram menos sensíveis aos extratos deste estudo.

Entretanto, quanto aos extratos que não inibiram o crescimento dos microrganismos, vale salientar que a ausência de halo de inibição não significa ausência de substâncias antimicrobianas em outras partes da planta ou nos presentes extratos, pois as moléculas menos polares ou as que possuem uma elevada massa molecular se difundem com menor velocidade no meio em que se encontram (VIRTUOSO et al., 2005). Desta forma, o presente estudo trabalhou com extratos hidroalcolícos que são fortemente polares e que possivelmente, podem ter influenciado na ausência de atividade antimicrobiana satisfatória em alguns extratos contra os microrganismos selecionados.

Em relação ao antibiograma realizado com os microrganismos *E.coli*, *Salmonella* spp e *Listeria monocytogenes*, a azitromicina 15 µg mostrou halos de inibição considerados como sensíveis segundo a classificação da CLSI

(2013), para este antibiótico assim justificando porque foi escolhido como o controle positivo para a presente estudo.

Sabe-se que o teste de difusão em ágar é de caráter qualitativo baseado na difusão das amostras pelo ágar para que ocorra a ação esperada, sendo que a falta de atividade antimicrobiana pode ser devido a difusão inadequada dos extratos sob análise (KARAMAN et al., 2003). Portanto, como análise complementar, foi realizado o teste de microdiluição para determinar a concentração inibitória mínima (CIM), que é considerado um teste quantitativo e uma técnica melhor para avaliar a suscetibilidade ou resistência das bactérias aos agentes antimicrobianos (OSTROSKY et al., 2008).

A literatura não mostra uma classificação padrão para os valores de CIM, mas segundo Aligiannis et al. (2001), CIM até $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ são inibidores potentes, CIM entre 600 e $1500 \mu\text{g mL}^{-1}$ são inibidores moderados, CIM maior que $1600 \mu\text{g mL}^{-1}$ são inibidores fracos. Por outro lado, Webster et al. (2008) consideraram como satisfatório, CIM igual ou menor de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Considerando a primeira classificação, os extratos das partes dos frutos de *Byrsonima orbignyana* A. Juss, *Pouteria glomerata* (Miq.) Radlk e *Vitex cymosa* Bert, podem ser classificados como inibidores moderados. Além disso, a maioria dos resultados desta pesquisa foram satisfatórias de acordo com a segunda classificação por terem apresentado valores menor que $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Os extratos de *Byrsonima cydoniifolia* A. Juss, foram capazes de inibir o crescimento dos microrganismos *E.coli*, *Salmonella* spp e *Listeria monocytogenes*, exibindo valores de CIM de $703,13 \mu\text{g mL}^{-1}$. Esses resultados corroboram com a pesquisa realizada por Rivero-Cruz et al. (2009) que estudaram a atividade inibitória das espécies do gênero *Byrsonima* frente as cepas de *E.coli*, os quais apresentaram valores de CIM de 510 a $1080 \mu\text{g mL}^{-1}$. Entretanto, os resultados desta pesquisa foram superiores aos valores de CIM apresentados pelo Michelin et al., (2008) de $6000 \mu\text{g mL}^{-1}$, em relação as espécies do gênero *Byrsonima* frente a *Salmonella* spp.

Estudos fitoquímicos realizados em folhas das plantas do gênero *Byrsonima*, isolaram e identificaram compostos químicos que pertencem ao grupo das substâncias fenólicas e dos terpenos. Os metabolitos secundários

mais encontrados nas espécies deste gênero foram os ácidos fenólicos e seus derivados, os flavonoides e derivados além dos compostos terpênicos e esteroidais (GIL et al., 2005; PEREIRA, 2011).

Ainda, segundo Prates (2012), foram determinados teores consideráveis de compostos fenólicos e taninos nos extratos do fruto de *Byrsonima cydoniifolia* A. Juss. Rivero-Cruz et al. (2009), isolaram os derivados dos flavonoides e terpenos presentes nas plantas do gênero *Byrsonima* e que demonstraram atividade antimicrobiana contra bactérias. Por outro lado, Michelin et al. (2008) observaram ação antibacteriana nos extratos polares das plantas do gênero *Byrsonima* e relacionaram essa atividade aos compostos fenólicos e os flavonoides identificados. Desta forma, a atividade antimicrobiana dos extratos do fruto de *Byrsonima cydoniifolia* A. Juss. no presente estudo, pode estar relacionada aos compostos fenólicos e seus derivados, além dos diferentes flavonoides e terpenos isolados nessas plantas.

A espécie de *Pouteria glomerata* (Miq.) Radlk, inibiu o crescimento dos microrganismos *E.coli*, *Salmonella* spp e *Listeria monocytogenes*, apresentando valores de CIM de 703,13 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Esses resultados são próximos aos dados apresentados por Nogueira (2012), que estudou atividade inibitória das espécies *Pouteria torta* (CIM de 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e *Pouteria ramiflora* Radlk (CIM de 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) contra as cepas de *E.coli*. Entretanto, Silva (2013), estudou atividade inibitória das espécies do gênero *Pouteria* e evidenciou a resistência da *E.coli*, frente aos extratos testados.

Batista (2013), pesquisou sobre os metabólitos secundários presentes no fruto de *Pouteria glomerata* (Miq.) Radlk e observou concentrações maiores de taninos e compostos fenólicos nesse fruto. Nogueira (2012), isolou os derivados dos flavonoides e triterpenos presentes no extrato da folha do gênero *Pouteria*, constatando atividade antimicrobiana maior contra as bactérias Gram-positivas do que com Gram negativas. Santos et al. (2014), observaram resultados semelhantes e relacionaram essa resposta aos derivados dos compostos fenólicos presentes nessas plantas. Portanto, o presente estudo sugere que a atividade antibacteriana da *Pouteria glomerata* (Miq.) Radlk, está em grande parte associada aos efeitos combinados/sinérgicos dos flavonoides e terpenos presentes.

Os flavonoides presentes nas plantas do gênero *Pouteria* agem através de um efeito agregante sobre as células bacterianas, sendo provável que os mesmos não matam as células bacterianas, porém induzem a formação de agregados, diminuindo a área de superfície e o consumo de oxigênio resultando na falta da síntese de ácidos nucleicos (CUSHNIE e LAMB, 2011; MICELI et al., 2011).

Por outro lado, os triterpenos presentes representam uma das classes de metabólitos secundários mais ativos quanto a atividade antimicrobiana; entretanto, o seu mecanismo de ação não está claramente estabelecido (CHUNG et al., 2011).

Os valores de CIM de $703,13 \mu\text{g mL}^{-1}$, apresentados pelos extratos da espécie *Vitex cymosa* Bert, mostraram atividade inibitória contra os microrganismos *E.coli*, *Salmonella* spp e *Listeria monocytogenes*, diferente do estudo desta mesma espécie realizado por Santos (2015), que mostrou valores de CIM maiores que $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ frente as cepas de *E.coli*. Segundo Santos (2007), esta variação da atividade inibitória sugere que as plantas do mesmo gênero ou espécie podem ter uma composição química diferente, apresentando concentrações diferentes de seus metabólitos secundários, o que pode ser influenciada pelas condições climáticas ou de cultivo da região.

O perfil fitoquímico do fruto de *Vitex cymosa* Bert., apresenta consideráveis teores de metabólitos secundários; compostos fenólicos, taninos e terpenos na sua estrutura química (LEITÃO et al., 2011; TAVARES e RAMOS, 2012). Fonseca et al. (2006), evidenciou a presença de óleos essenciais nesse fruto em que foi isolado o butanolídeo; γ -decalactona que, segundo Hashemi et al. (2013), é capaz de inibir o crescimento das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Portanto, o presente estudo sugere que a atividade antibacteriana do nosso extrato de *Vitex cymosa* Bert., pode ser, em parte, pela presença desses butanolídeos, além dos compostos fenólicos, taninos e terpenos.

Não foram encontrados, na literatura, estudos que avaliam a susceptibilidade da bactéria *Listeria monocytogenes* na presença dos extratos das plantas dos gêneros *Byrsonima*, *Pouteria* ou *Vitex*, assim o presente estudo mostrou a importância desses frutos como possíveis agentes antimicrobianos

contra bactérias que podem causar complicações severas de saúde em determinados grupos da população.

Ao analisar os resultados, foi evidente que a *Listeria monocytogenes*, uma bactéria Gram-positiva, foi sensível frente a maioria dos extratos testados em comparação com as bactérias Gram negativas; *E.coli* e *Salmonella* spp. Esses resultados estão de acordo com estudos preliminares que constataram maior sensibilidade das bactérias Gram-positivas na presença dos metabólitos secundários que possuem potencial antimicrobiano (TADEG et al., 2005; SILVA, 2013).

Ainda, a partir dos resultados do presente estudo, foi observado que os extratos das sementes de *Byrsonima cydoniifolia* A. Juss e *Pouteria glomerata* (Miq.) Radlk, foram mais ativas do que os extratos da casca+polpa das mesmas espécies frente as três bactérias selecionadas, apresentando valores de CIM menor que 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Por outro lado, tanto os extratos das partes verdes quanto os das partes maduras do fruto de *Vitex cymosa* Bert., inibiram os três microrganismos testados. Isso demonstra que as diferentes partes do fruto e da planta em geral, apresentam diferentes compostos químicos em termos de qualidade e quantidade, podendo resultar em diferentes atividades biológicas (PEREIRA, 2011).

O teste da CMM possibilitou identificar se a inibição foi bacteriostática ou bactericida e revelou que os extratos da casca+polpa verde de *Byrsonima cydoniifolia* A. Juss, e *Pouteria glomerata* (Miq.) Radlk., apresentaram ação bactericida contra a *Listeria monocytogenes*, enquanto, o extrato a 20% da casca+polpa madura de *Pouteria glomerata* (Miq.) teve ação bactericida contra a *Salmonella* spp. Os demais extratos com valores de CIM menor que 1000 $\mu\text{g/mL}$, apresentaram ação bacteriostática frente aos três microrganismos selecionados, justificando a capacidade antibacteriana dos metabólitos secundários presentes nas três espécies de plantas selecionadas para este estudo.

Após a análise dos resultados obtidos por meio dos testes de atividade antimicrobiana das três espécies de plantas utilizadas neste estudo, foi constatado que os extratos hidroalcoólicos dos frutos de *Byrsonima cydoniifolia*

A. Juss., *Pouteria glomerata* (Miq.) Radlk. e *Vitex cymosa* Bert., apresentam capacidade de inibir o crescimento de bactérias transmitidas por alimentos, entre eles, os produtos cárneos.

7. CONCLUSÕES

Os frutos canjiqueira, laranjinha de pacu e tarumã apresentaram atividade antimicrobiana contra as bactérias *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes*.

Os três frutos apresentaram maiores halos de inibição e valores significativos da concentração inibitória mínima em relação a *Listeria monocytogenes* do que a *E.coli* e *Salmonella* spp, sendo que entre as três bactérias, a *Listeria monocytogenes* foi a mais sensível aos extratos dos frutos selecionados.

Os frutos canjiqueira e laranjinha de pacu, se destacaram por apresentar ação bactericida contra a *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp.

No antibiograma das cepas, a azitromicina 15 µg se destacou por apresentar halos de inibição sensíveis contra as três bactérias selecionadas.

Estudos futuros são necessários para esclarecer os mecanismos de ação dos frutos selecionados e a possível incorporação desses como alternativos para antibióticos promotores de crescimento e conservantes químicos usados em alimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aligiannis N, Kalpotzakis E, Mitaku S, Chinou IB. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001; 40: 4168-4170.

Batista LCL. Qualidade nutricional e atividade antioxidante de laranjinha de pacu (*Pouteria glomerata* (Miq.) Radlk.) do cerrado e do pantanal [dissertação]. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS; 2013.

Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *American Journal of Clinical Pathology*. 1966; 45: p. 493-496.

BEUC, The European Consumer Organization. Antibiotic use in livestock: Time to act. BEUC position paper, 2014.

Botre DA. et al. Avaliação de filme incorporado com óleo essencial de orégano para conservação de pizza pronta. *Rev. Ceres, Viçosa, mai/jun, 2010; 57(3): p. 283-291.*

Botsoglou NA, Florou-Paneri P, Christaki E, Fletouris DJ, Spais AB. Effect of dietary oregano essential oil on performance of chickens and on iron-induced lipid oxidation of breast, thigh and abdominal fat tissues. *British Poultry Science*, 2002; 43(2): 223–230.

Boxall ABA, Johnson P, Smith EJ, Sinclair CJ, Stutt E, Levy LS. Uptake of veterinary medicines from soils into plants. *J. Agric. Food Chem.* 2006; 54: 2288-2297.

Brandão LG, Antas PTZ, Oliveira LFB, Jorge-Pádua MT, Pereira NC, Valutky WW. Plano de Manejo da Reserva Particular de Patrimônio Natural do SESC Pantanal. 2 ed. In:____. *Conhecendo o Pantanal 3*. Rio de Janeiro, SESC Departamento Nacional; 2011. p. 148.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal (PNCRC/Animal), 2012 [acesso em 28 jul. 2015]. Disponível em:

<http://www.agricultura.gov.br/animal/qualidade-dos-alimentos/residuos-e-contaminantes>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Informe técnico nº. 42, 21/07/ 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 540, Brasília, DF, 27 out. 1997. Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos alimentares.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 1004, Brasília, 11 dez. 1998. Aprova o Regulamento Técnico: Atribuição da função de aditivos, aditivos e seus limites máximos de uso para a categoria 8 – carne e produtos cárneos.

Busatta C, Vidal RS, Popiolski AS, Mossi AJ, Dariva C, Rodrigues MR, Corazza FC, Corazza ML, Vladimir OJ, Cansian RL. Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. Food Microbiology. 2008; 25(1): 207-211.

Caldeira SD, Hiane PA, Ramos MIL, Ramos Filho MMR. Caracterização físico-química do araçá (*Psidium guineense* SW) e do tarumã (*Vitex cymosa* Bert.) do Estado de Mato Grosso do Sul. Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos, Curitiba, 2004; 22(1): p. 145-154.

Carramiñana JJ, Rota C, Burillo J, Herrera A. Antibacterial efficiency of Spanish Satureja montana essential oil against *Listeria monocytogenes* among natural flora in minced pork. Journal of Food Protection. 2008; 71(3): 502-508.

Chung PY, Navaratnam P, Chung LY. Synergistic antimicrobial activity between pentacyclic triterpenoids and antibiotics against *Staphylococcus aureus* strains. Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob., 2011; 9. p. 10-25.

CLSI. Manual Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standards- 6th ed. Document M7-A6 performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA., 2006.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eighth Edition. CLSI document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA., 2003.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-third Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA., 2013.

Cunha FA. Determinação de nitritos em alimentos cárneos. Revista Brasileira de Análises Clínicas (RBAC) 2003; 35(1): p. 3-4.

Cushnie TP, Lamb AJ. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. Int. J. Antimicrob. Agents., 2011; 38(2): 99 - 107.

Damasceno Junior GA, Souza PR. Sabores do Cerrado & Pantanal: receitas e boas práticas de aproveitamento. Campo Grande: Editora UFMS, 2010. p. 141.

Dantas JP, Benvindo SF, De Souza JH, De Almeida JM, Figueiredo MC, Pequeno AS, Arruda TA, Antunes PM, Catão RM. Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos hidroalcoólico de angico sobre cepas de *Staphylococcus aureus*. RBAC, 2010; 42(1): 33-37.

Da Silva M, Monteiro GLM, Ribeiro ROR, Guimarães MFC, Mano BS, Mársico TE, Pardi SH. Presença de aditivos conservantes (nitrito e sulfito) em carnes bovinas moídas, comercializadas em mercados varejistas. R. bras. Ci. Vet. 2009; 16(1): 33-36.

Dorman HJ, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. Journal Applied Microbiology, 2000; 88: p. 308-316.

Edqvist LE, Pedersen KB. "Antimicrobials as Growth Promoters: Resistance to Common Sense." In European Environment Agency (eds.) Copenhagen: European Environment Agency. Late Lessons from Early Warnings: The Precautionary Principle, 2001; 1896–2000.

EC, European Parliament and Council of the European Union - Directive 2006/52/EC of the European Parliament and of the Council of 5 July amending

Directive 95/2/EC on food additives other than colours and sweeteners and Directive 94/35/EC on sweeteners for use in foodstuffs.

Fai AEC, Stamford TCM, Stamford TLM. Potencial biotecnológico de quitosana em sistemas de conservação de alimentos. Rev. Iberoam. Polim. 2000; 9(5): 435-451.

FAO/WHO, Joint FAO/WHO, Expert Committee of Food Additives Sulfur Dioxide, 1974 (acesso em June 27, 2007). Disponível em: www.inchem.org/documents/jecfa/jecval/jec_2215.htm.

Farber JM, Peterkin PI. *Listeria monocytogenes*: a food-borne pathogen. Microbiological Reviews, 1991; 55(3). p. 476-511.

Farmacopéia Brasileira. 5th ed. São Paulo: Atheneu; 2010. v. 1-2.

FDA Bad bug book: Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook, 2nd edition. US Food and Drug Administration, Silver Spring, 2012. p. 100-104.

Fennema OR. Química de los alimentos. Zaragoza: Acribia, 1993.

Ferreira ABB. Pantanal Mato-Grossense: considerações sobre a proteção constitucional para um desenvolvimento econômico sustentável. Interações, Campo Grande. 2013; 14(1): 11-20.

Figueredo, FG. Modulation of the Antibiotic Activity by Extracts from *Amburana cearensis* (A.C) Smith and *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan. BioMed Research International. Juazeiro do Norte. 2013; 1: 1-5.

Fonseca EM, Figer A, Furtado DT, Lopes D, Alviano DS, Alviano CS, *et al.* Análise química e atividade antimicrobiana do óleo essencial dos frutos de *Vytex cymosa* Bertero. Rev. Bras. Pl. Med. 2006; 8(4):87-91.

Forsythe SJ. Microbiologia da segurança alimentar. Porto Alegre: Artmed; 2002.

Franco BDGM, Landgraf M. Microbiologia dos alimentos. São Paulo: Editora Atheneu, 2007. p. 182.

Franco BDGM, Landgraf M. Microrganismos patogênicos de importância em alimentos. In:_____. Microbiologia dos alimentos. São Paulo: Atheneu, 2008; 4: p. 33-82.

Fukushima RS, Weimer PJ, Kunz DA. Use of photocatalytic reduction to hasten preparation of culture media for saccharolytic *Clostridium* species. Brazilian Journal of Microbiology, 2003; 34(1): 22-26.

Germano PML, Germano MIS. Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos. São Paulo: Livraria Varela, 2001. p. 629.

Gil SG, Serrano SHP, Soares LA, Rezende KR. Atividade antioxidante de extrato etanólico e hidroalcoólico de “canjiqueira” (*Byrsonima orbygniana*). Doseamento de rutina, quercetina, ácido elágico e ácido ascórbico. Revista Eletrônica de Farmácia, 2005; 2(2): 85-88.

Goldman L, Ausiello D. Cecil medicina. Rio de Janeiro: Elsevier. 2009. p. 3458.

Gonçalves AL, Alves-Filho A, Menezes H. Atividade antimicrobiana do mel de abelha nativa sem ferrão *Nannotrigona testaceicornis* (Hymenoptera; apidae, meliponini). Arq. Inst. Biol., São Paulo, 2005; 72(4): 455-459.

Górniak SL, Spinosa HS. Antimicrobianos na Avicultura- Usos e Restrições, In: Saúde Aviária e Doenças. Ed. Andreatti Filho RL. 2007. p. 35-40.

Harada K, Asai T. Role of Antimicrobial Selective Pressure and Secondary Factors on Antimicrobial Resistance Prevalence in *Escherichia coli* from Food-Producing Animals in Japan [special issue]. Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2010. p. 12.

Haraguchi LMM, Carvalho OBD. Plantas Medicinais. 1ª. São Paulo. 2010.

Hashemi M, Ehsani A, Jazani HN, Aliakbarlu J, Mahmoudi R. Chemical composition and *in vitro* antibacterial activity of essential oil and methanol extract of *Echinophora platyloba* D.C against some of food-borne pathogenic bacteria. Veterinary Research Forum. 2013; 4(2): 123-127.

Hernandez F, Madrid J, García V, Orengo J, Megyas MD. Influence of two plant extracts on broilers performance, digestibility, and digestive organ size. Poultry Science, 2004; 83: 169–174.

HiMedia Laboratories. Technical data for Mueller Hinton agar, M1084, revision 1. Swastik Disha Business Park, Mumbai, India. 2011.

Holley RA, Patel D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*, 2005; 22: p. 273-292.

Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Williams ST. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. p. 787.

Hughes P, Heritage J. Antibiotic growth promoters in food animals. School of Biochemistry and Molecular Biology, University of Leeds, United Kingdom, 2002.

Huidobro REM, Blazquez B, Onega E. A comparison between two methods (Warner-Bratzler and texture profile analysis) for testing either raw meat or cooked meat. *Meat Sci.* 2005; 69: 527-536.

Humphrey T, Jorgensen F. Review. Pathogens on meat infection in animals establishing a relationship using *Campylobacter* and *Salmonella* as examples. *Meat Science*, 2006; 74: 89–97.

ICMSF. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. *Listeria monocytogenes*. *Microorganismos de los alimentos, Características de los patógenos microbianos*. Zaragoza: Acribia, 1998. p. 606.

Ingham SC, Beuge DR, Dropp BK, Losinski JA. Survival of *Listeria monocytogenes* during storage of ready-to-eat meat products processed by drying, fermentation, and/or smoking. *Journal of Food Protection*, 2004; 67. p. 2698-2702.

Jay JM. *Microbiologia de alimentos*. Ed 6. Porto Alegre: Artmed, 2005.

Jiménez-Colmenero F, Solana BJ. *Handbook of Processed Meats and Poultry Analysis*. 2009. p. 91-103.

Karaman İ, Şahin F, Güllüce M, Öğütçü H, Şengül M, Adigüzel A. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. *J Ethnopharmacol*, 2003; 85: 231-235.

Kemper N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecol. Indic*, 2008; 8: 1-13.

Kovacevic J, Mekac LR, Allen KJ. Occurrence and characterization of *Listeria* spp. in ready-to-eat retail foods from Vancouver, British Columbia. *Food Microbiology*, 2012; 30. p. 372-378.

Kusamran WR, Ratanavila A, Tepsuwan A. Effects of neem flowers, Thai and Chinese bitter melon, fruits and sweet basil leaves on hepatic monooxygenases and glutathione-S-transferase activities, and in vitro metabolic activation of chemical carcinogens in rats. *Food Chem Toxicol*, 1998; 36: 475-84.

Lado B, Yousef AE. Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors. Chapter 6 In: Ryser ET, Marth EH (eds) *Listeria, listeriosis and food safety*. 3rd edition, CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2007; p. 157–213.

Langhout P. A visão da indústria e recentes avanços. In: ____ Conferência APINCO 2005, Santos, SP. Anais... Conferência APINCO 2005 de Ciência e Tecnologia Avícola, Santos, p. 21-33, 2005.

Lederer J. Enciclopédia moderna de higiene alimentar. Intoxicações alimentares. São Paulo: Manole Dois, 1991; 4.

Leitão SG, Santos TC, Monache FD, Matheus ME, Fernandes PD, Marinho BG. Phytochemical profile and analgesic evaluation of *Vitex cymosa* leaf extracts. *Rev Bras Farmacogn*. 2011; 21(5): 874-83.

Lima IO, Oliveira RAG, Lima EO, Farias NMP, Souza EL. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. *Rev Bras de Farmacogn*. 2006; 16(2): 197-201.

Lorenzi H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 2ed. Nova Odessa: Plantarum, 2002.

Machado FT, Borges FM, Bruno ML. Aplicação de antimicrobianos naturais na conservação de alimentos. Embrapa Agroindústria Tropical. Fortaleza, CE. 2011.

Machado H, Nagem TJ, Peters VM, Fonseca CS, Oliveira TT. Flavonoides e seu potencial terapêutico. Boletim do Centro de Biologia da Reproducao, Juiz de Fora. 2008; 27(1/2): 33-39.

Machado RB, Aguiar LMS. A ocupação do cerrado e os menosprezados impactos sobre a biodiversidade. Revista da Universidade Federal de Goiás. 2010; 9(12): 8-15.

Manning SD, Madera RT, Schneider W, Dietrich SE, Khalife W, Brown W, Whittam TS, Somsel P, Rudrick JT. Surveillance for Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, Michigan, 2001–2005. Emerging Infectious Diseases, 2007; 13(2) 318–321.

Mamede MCH. *Byrsonima*. In:____. Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2012.

Mantilla SPS, Franco RM, Oliveira LAT, Santos EBS, Gouvêa R. Resistência antimicrobiana de bactérias do gênero *Listeria* spp. isoladas de carne moída bovina. Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, 2008; 45(2): 116-121.

Miceli N, Trovato A, Marino A, Bellinghieri V, Melchini A, Dugo P, Cacciola F, Donato P, Mondello L, Güvenç A, De Pasquale R, Taviano MF. Phenolic composition and biological activities of *Juniperus drupacea* Labill. berries from Turkey. Food Chem. Toxicol. 2011; 49(10): 2600 – 2608.

Michelin CD, Sannomiya M, Figueiredo EM, Rinaldo D, Dos Santos CL, Souza-Brito M, Alba R, Vilegas W, Salgado NRH. Antimicrobial activity of *Byrsonima* species (Malpighiaceae). Brazilian Journal of Pharmacology, 2008; 18 (supl): 690-695.

Mohammed MAM. Molecular characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from meat products sold at Mansoura city, Egypt. Food Control, 2012; 25: p.159- 164.

Montenegro LHM, Oliveira PES, Conserva LM, Rocha EMM, Brito AC, Araújo RM, Trevisan MTS, Lemos RPL. Terpenóides e avaliação do potencial antimalárico, larvicida, anti-radicalar e anticolinesterásico de *Pouteria venosa* (Sapotaceae). Revista Brasileira de Farmacognosia, 2006; 16. p. 611-617.

Murarolli VDA. Efeito de prebióticos, probióticos e simbióticos sobre o desempenho, morfologia intestinal e imunidade de frangos de corte [Dissertação]. Universidade de São Paulo – USP, Pirassununga, 2008.

Nogueira GL. Avaliação do potencial antimicrobiano de *Pouteria* spp. e de triterpenos quinonametídeos com enfoque no *Helicobacter pylori* [dissertação]. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, São Paulo, 2012.

O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, 2000; 267(17): 5421-5426.

Ostrosky EA, Mizumoto MK, Lima MEL, Kaneko TM, Nishikawa SO, Freitas BR. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2008; 18(2): 301-307.

Palomino JC, Martin A, Camacho M, Guerra H, Swings J, Portaels F. Resazurin Microtiter Assay Plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2002; 46(8): 2720-2722.

Pardi MC, Santos FI, Souza ER, Pardi HS. Ciência, higiene e tecnologia da carne. Goiânia: CEGRAF-UFG/Niterói: EDUFF, 2001; 2.

Perez-Montano J, Gonzalez-Aguilar D, Barba J, Pachecogallardo C, Campos-Bravo CA, Garcia S, Heredia NL, Cabreradiaz, E. Frequency and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes on beef carcasses at small abattoirs in Jalisco State, Mexico. *Journal of Food Protection*, 2012; 75(5): p. 867-873.

Pereira VV. Estudo fitoquímico de *Byrsonima coccolobifolia* Kunth (Malpighiaceae) e de atividade biológica de espécies do gênero *Byrsonima* [dissertação]. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, UFVJM, 2011.

Pott A, Pott VJ. Plantas do Pantanal. EMBRAPA. 1994. p. 320.

Pott A, Pott VJ, Bueno Sobrinho AAB. Plantas úteis a sobrevivência no Pantanal. In:____. IV Simpósio sobre Recursos Naturais e Socioeconômicos do Pantanal. Anais; 2004; Corumbá, Brasil. Corumbá: 2004. p. 39-40.

Pozzo DM, Viegas J, Santurio FD, Rossatto L, Soares HI, Alves HS, da Costa MM. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a *Staphylococcus* spp isolados de mastite caprina. Ciência Rural, Santa Maria, 2011.

Prager R, Annemuller S, Tschape H. Diversity of virulence patterns among shiga toxin-producing *Escherichia coli* from human clinical cases – need for more detailed diagnostics. International Journal of Medical Microbiology, 2005; 295: 29–38.

Prates MFO. Potencial Nutritivo e Compostos Bioativos em Frutos de Canjiqueira: Pós-colheita e Processamento [tese]. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande, MS; 2012.

Rivero-Cruz JF, Sánchez-Nieto S, Benítez G, Casimiro X, Alvarado CI, Molina AR, Rivero-Cruz, B. Antibacterial compounds isolated from *Byrsonima crassifolia*. Revista Latinoamericana de Química, 2009; 37: 155-163.

Rocourt J, Buchrieser C. The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: Phylogenetic position, taxonomy, and identification. Chapter 1 In: Ryser ET, Marth EH (eds) *Listeria*, listeriosis and food safety. 3rd edition, CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2007. p. 1–20

Rodrigues GA, Amaral FCA. Aspectos sobre o desenvolvimento da fitoterapia. Plantas Medicinais e Fitoterapia na Atenção Básica. In:____. Cadernos de Atenção Básica; Práticas Integrativas e Complementares. Brasil: Ministério da Saúde, 2012.

Rozatto RM. Determinação da atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos, frações e compostos isolados de *Arrabidaea brachypoda* [dissertação]. Universidade Estadual Paulista “ Julio de Mesquita Filho” Campus de Araraquara, São Paulo; 2012.

Salman AKD, Paziani FS, Soares GPJ. Utilização de ionóforos para bovinos de corte. Embrapa, 2006.

Santana ES, Mendes RF, Barnabé SCA, De Oliveira HF, Andrade AM. Uso de produtos alternativos aos antimicrobianos na avicultura. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer, Goiânia. 2011; 7(11): 986.

Santos BF. Atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos dos frutos do cerrado *Genipa americana* L., *Dipteryx alata* Vog. e *Vitex cymosa* Bert [dissertação]. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande MS, 2015.

Santos RFEP, SILVA ISM, VERÍSSIMO RCSS, LÚCIO IML, CAMPESATTO EA, CONSERVA LM, BASTOS MLA. Estudo do potencial antimicrobiano e citotóxico da espécie *Pouteria venosa* (Sapotaceae). Rev. Bras. Pl. Med., Campinas, 2014; 17(3): 367-373.

Santos SA, Abreu UGP, Tomich TR, Comastri Filho JA, Crispim SMA. Pecuária no Pantanal: em busca da sustentabilidade. In: Albuquerque ACS, Silva AG. Agricultura tropical: quatro décadas de inovações tecnológicas, institucionais e políticas. v. 2. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. 2008. p. 535-570.

Santos RI. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia da planta ao medicamento. 6 ed. Porto Alegre: UFRGS. 2007.p. 404-434.

Santos SS, Feiden A, Simão MT, Salis SM. Sistemas silvipastoris naturais e alterados no Pantanal. Revista Brasileira Agropecuária. 2009; 44(2): p. 1559.

Silva MG. Potencial antioxidante de frutos do cerrado e do pantanal, no estado de mato grosso do sul [dissertação]. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande, MS; 2010.

Silva MMS. Avaliação da atividade antimicrobiana de espécies vegetais do bioma do cerrado [dissertação]. Universidade de Brasília, 2013.

Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA, Taniwaki MH, Santos RFS, Gomes RAR. Manual de métodos de análises microbiológica de alimentos e água. 4 ed. São Paulo: Livraria Varela, 2010. p. 632.

Siquiera-Filho AM. Envelhecimento e musculo esquelético: força muscular, atividade proteossomal e sinalização relacionada ao balanço proteico [dissertação]. Universidade de São Paulo, USP; 2012.

Sugimura T, Wakabayashi K. Carcinogênios nos alimentos. In: Shills ME, Olson JA, Moshi S, Rossi C, organizadores. Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença. v. II. 9a Ed. Barueri: Editora Manole; 2003. p. 1343-5.

Tadeg H, Asres k, Gebre-Mariam T. Antimicrobial activities of some selected traditional Ethiopian medicinal plants used in the treatment of skin disorders. J. Ethnopharmacol, 2005; 100. p. 168-175.

Tavares SSM, Ramos MIL. Atividade antioxidante de frutos do cerrado e do pantanal, do estado de Mato Grosso do Sul: padronização de metodologias. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2012.

Traesel CK, Wolkmer P, Schmidt C, Silva BC, Paim FC, Rosa PA, Alves HS, Santurio MJ, Lopes ATS. Serum biochemical profile and performance of broiler chickens fed diets containing essential oils and pepper. Comparative Clinical Pathology, 2011; 20(5): 453-460.

Varnam AH. Foodborne pathogens. St. Louis: Mosby Year Book, 1991. p. 557.

Virtuoso S, Davet A, Dias JFG, Cunico MM, Miguel MD, Oliveira AB, Miguel OG. Estudo preliminar da atividade antibacteriana das cascas de *Erythrina velutina* Willd., Fabaceae (Leguminosae). Rev. Bras. Farmacogn. 2005; 15(2).

Webster D, Taschereau P, Belland RJ, Sand C, Rennie RP. Antifungal activity of medicinal plant extracts; preliminary screening studies. Journal of Ethnopharmacology, 2008; 115: 140–146.

Williams JE. Review of antiviral and immunomodulating properties of plants of the Peruvian rainforest with a particular emphasis on Unã de Gato and Sangre de Gatro. Altern. Med. Rev. Saindpoint. 2001; 6(6): 567-579.

WHO, World Health Organization. Use of antimicrobials outside human medicine and resultant antimicrobial resistance in humans. Fact sheet n° 268, jan. 2002 [acesso em 28 jul. 2015]. Disponível em: <http://www.who.int/en/>.

WHO, World Health Organization. Drug-resistance Salmonella. Fact Sheet Nº 139. Revised April 2005. [Acesso em 28 jun 2015] Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>

WHO, World Health Organization. Tackling antibiotic resistance from a food safety perspective in Europe, 2011.

Zhang M, Wan-Xue L, Meng-Fei Z, Qiao-Lin X, Fang-Hao W, Wang J, Lei T, Zhong-You Z, Jian-Wen T. Bioactive quinic acid derivatives from *Ageratina adenophora*. *Molecules*, 2013.