

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Instituto de Biologia**  
**Curso de Ciências Biológicas - Bacharelado**



Trabalho de Conclusão de Curso

**Atividade antibacteriana de óleos essenciais frente *E. coli* e *Salmonella* spp. isoladas de alimentos minimamente processados**

**Aline Sitowski**

Pelotas, 2018

**Aline Sitowski**

**Atividade antibacteriana de óleos essenciais frente *E. coli* e *Salmonella*  
spp. isoladas de alimentos minimamente processados**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado no Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas como requisito básico para a conclusão do Curso de Ciências Biológicas Bacharel.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Gladis Aver Ribeiro

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

S111a Sitowski, Aline

Atividade antibacteriana de óleos essenciais frente e. coli e salmonella spp. isoladas de alimentos minimamente processados / Aline Sitowski ; Gladis Aver Ribeiro, orientadora. — Pelotas, 2018.

35 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) — Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Infecção alimentar. 2. Escherichia coli. 3. Salmonella. 4. Alimentos. 5. Óleo essencial. I. Ribeiro, Gladis Aver, orient. II. Título.

CDD : 614.511

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

Aline Sitowski

**Atividade antibacteriana de óleos essenciais frente *E. coli* e *Salmonella* spp. isoladas de alimentos minimamente processados**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 27/ 11/2018

Banca examinadora:

Prof. Dr<sup>a</sup> Gladis Aver Ribeiro.....

Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Eduardo Bernardi.....

Doutor em Sistemas de Produção Agrícola Familiar pela Universidade Federal de Pelotas.

Bióloga Kamila Furtado da Cunha.....

Mestranda em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas.

## Resumo

SITOWSKI, Aline. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais frente *E. coli* e *Salmonella* spp. isoladas de alimentos minimamente processados.** 2018. 35f. Trabalho de Conclusão de Curso. Curso de Graduação Ciências Biológicas Bacharelado, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

A expansão populacional juntamente com a rotina de trabalho acelerada levou a necessidade de alimentos nutritivos e práticos. Desta forma, os alimentos minimamente processados ganharam espaço no mercado devido a sua praticidade, frescor e nutrientes semelhantes aos vegetais e frutas *in natura*. Por esses alimentos não passarem por processo de cocção é necessário maior cautela quanto a possível presença de bactérias patogênicas. Entretanto uma estratégia utilizada para o combate dessas contaminações é a utilização de óleos essenciais no alimento ou na embalagem deste. Em virtude disso foram isoladas, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp de alimentos minimamente processados a base de verduras, hortaliças e frutas, através. Posteriormente foram determinadas concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) de óleos essenciais, de acordo com a metodologia da NCCLS. Os óleos essenciais de cardamomo (*Elettaria cardamomum*), manjericão (*Ocimum basilicum*) e cravo botão (*Eugenia caryophyllus*) obtiveram as melhores respostas inibitórias e bactericidas, nas concentrações 6,72, 5,89 e 1,9mg/mL respectivamente, frente as duas bactérias isoladas.

**Palavras – chave:** infecção alimentar, *Escherichia coli*; *Salmonella*; alimentos; óleo essencial

## Abstract

SITOWSKI, Aline. **Antibacterial activity of essential oils against *E. coli* and *Salmonella* spp. isolated from minimally processed foods.** 35l. 2018. Project for the Conclusion of the Course. Biological Sciences Bachelor Degree, Institute of Biology, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2018

Population expansion coupled with the accelerated work routine brought with it several impasses, one of them being the need for nutritious and practical food. In this way the minimally processed foods gained space in the market due to its practicality, freshness and nutrients similar to vegetables and fruits in natura. Because these foods do not go through the cooking process, greater caution is needed regarding the presence of pathogenic bacteria. One strategy used to combat these contaminations is the use of essential oils in the food or in the packaging. Because of this, *Escherichia coli* and *Salmonella* spp were isolated from minimally processed foods based on vegetables, vegetables and fruits. Subsequently, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) tests were performed with essential oils. The essential oils of cardamom (*Elettaria cardamomum*), basil (*Ocimum basilicum*) and clove (*Eugenia caryophyllus*) obtained the best inhibitory and bactericidal responses at concentrations 6,72, 5,89 and 1,9mg/mL respectively, compared to the two isolated strains.

**Key - words:** bacteria; *Escherichia coli*; *Salmonella*; foods; essential oil

## Sumário

1. Introdução.....	8
1.1. Objetivos.....	8
1.1.1. Objetivo Geral.....	8
1.1.2. Objetivos específicos.....	9
2. Revisão Bibliográfica.....	10
2.1. Alimentos minimamente processados.....	10
2.2. Contaminações de alimentos.....	11
2.3. Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA).....	11
2.3.1. <i>Escherichia coli</i> .....	12
2.3.2. <i>Salmonella</i> spp.....	13
2.4. Óleos essenciais.....	14
3. Materiais e métodos.....	16
3.1. Processo de isolamento.....	16
3.1.1. Contagem de coliformes a 45°C e isolamento de <i>Escherichia coli</i> .....	16
3.1.2. Isolamento e identificação de <i>Salmonella</i> spp.....	17
3.2. Avaliação antibacteriana.....	18
3.2.1. Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	18
3.2.2. Concentração Bactericida Mínima (CBM).....	20
4. Resultados e discussão.....	22
4.1. Isolados de alimentos minimamente processados.....	22
4.2. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos óleos essenciais	23
5. Conclusão.....	28
Referências.....	29

## **1. Introdução**

O aumento intensivo da população assim como o acelerado cotidiano interveio na necessidade da disposição de alimentos rápidos e com teor de nutrientes suficientemente altos. (MORETTI, 2007). Desta forma surgiram os alimentos minimamente processados atendendo a demanda da população. Os mesmos são consumidos sem passar por qualquer processo térmico, são necessários maiores cuidados em relação a contaminações por micro-organismos.

Segundo a resolução da ANVISA (2001) alimentos minimamente processados e prontos para consumo exigem a ausência de *Salmonella* spp. e a tolerância de até  $5 \times 10^2$  log. UFC/g  $\text{mL}^{-1}$  para coliformes a  $45^\circ\text{C}$  em alimentos com base de frutas, e  $10^2$  quando a base são hortaliças. Ainda assim existem diversos estudos que revelam o não cumprimento dessa resolução, oferecendo riscos à saúde do consumidor.

Outra problemática é o aumento de cepas bacterianas resistentes a antibacterianos, devido a isso alternativas naturais têm sido cada vez mais procuradas, dentre elas o uso de óleos essenciais.

Visto a falta de trabalhos relacionados a contaminações microbiológica dos alimentos minimamente processados na cidade de Pelotas, RS, associado ao perigo ofertado pelas bactérias ao consumidor, faz-se necessário o aumento de informações quanto a possíveis contaminações destes alimentos assim como a disponibilização de alternativas viáveis para controle bacteriano em alimentos “in natura”.

### **1.1. Objetivos**

#### **1.1.1 Objetivo geral**

- Avaliar contaminações de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. de alimentos minimamente processados comercializados em mercados de Pelotas, RS



e, verificar a sensibilidade das cepas isoladas frente a óleos essenciais de plantas de importância medicinal e condimentar.

### **1.1.2. Objetivos específicos**

- Isolar, identificar bioquimicamente e quantificar *Escherichia coli* por número mais provável, nas amostras de alimentos;
- Isolar e identificar *Salmonella* spp. nas amostras de alimentos;
- Analisar a concentração inibitória mínima de óleos essenciais frente aos isolados obtidos;
- Analisar a concentração bactericida mínima de óleos essenciais distintos.

## 2. Revisão bibliográfica

### 2.1. Alimentos minimamente processados

Segundo a Resolução - RDC nº 12 da ANVISA (2001) os alimentos minimamente processados se enquadram em frutas e hortaliças frescas "in natura", preparadas (descascadas, selecionadas ou fracionadas) sanificadas para consumo direto, e possui como padrão microbiológico sanitário a tolerância de  $5 \times 10^2$  log. UFC/g  $\text{mL}^{-1}$  para coliformes termotolerantes em frutas e  $10^2$  para hortaliças e, ausência de *Salmonella* spp. para ambos os casos, por grama de alimento.

Em meados dos anos 70, estabeleceu-se nos EUA a tecnologia de processamento mínimo dos vegetais, vindo a surgir no Brasil na década de 90. Essa técnica veio ganhando cada vez mais espaço no mercado consumidor, devido ao fato de dar mais praticidade ao consumidor, visando manter o máximo período de vida útil do alimento com frescor e valores nutricionais muito próximos ao do produto *in natura* (ALVARENGA et. al, 2014).

Conhecidos como 'prontos para consumo' os alimentos minimamente processados abrangem vegetais ou frutas que passaram por processos como sanitização, descasque, corte e embalagem, ou seja, alimentos que foram fisicamente alterados, mas mantiveram seu aspecto fresco, segundo o International Fresh-Cut Producers Association (IFPA, 2018).

Contudo os procedimentos utilizados nesses alimentos podem interferir na qualidade dos mesmos, de acordo com Silva et al. (2012), o próprio manuseio aumenta a respiração do fruto acelerando sua senescência. Além disso o ato de descascar ou cortar o alimento, expõem seus tecidos internos a contaminações por micro-organismos antes evitados pela casca (DE PAULA et al, 2009).

## **2.2. Contaminação de alimentos**

Frutos e verduras até chegarem às prateleiras nos comércios como minimamente processados passam por várias etapas como, rega, colheita, higienização, transporte, descasque, corte e embalagem (MORETTI, 2007). Devido ao risco de contaminação sofrida nos alimentos ao longo das etapas para sua comercialização, Bergamini e colaboradores (2006) analisaram a qualidade da água e das hortaliças de 45 cadeias produtivas, investigando desde a qualidade microbiológica na irrigação do canteiro até o produto final nas prateleiras do mercado e puderam certificar que a contaminação se apresentou ao longo das etapas da cadeia de produção, tanto para coliformes a 45°C quanto para *Salmonella* spp.

De forma semelhante, Tresseler e colaboradores (2009) averiguaram a qualidade microbiológica de hortaliças minimamente processadas após a colheita, a sanitização e o tempo de armazenamento refrigerado, desta forma foi possível comparar a efetividade do processo de sanitização, que se apresentou ineficiente à eliminação de bactérias.

O fator temperatura pode também influenciar na qualidade microbiológica, enquanto há trabalhos que afirmam que a temperatura ideal de armazenamento de alimentos minimamente processados é de 2 a 5°C em média, NASCIMENTO e colaboradores (2003) mostra que nas gôndolas dos mercados as temperaturas apontam uma média de 10°C, facilitando a multiplicação de microrganismos.

Mesmo com a regulamentação vigente desde 2001, há diversos trabalhos que demonstram negligência tanto por parte dos produtores dos alimentos quanto por parte da fiscalização dos mesmos (WELKER et al. 2010; FERREIRA et al. 2016; PINHEIRO et al. 2005; TRESSELER et al. 2009; BRUNO et al. 2005; DE PAULA et al 2009).

## **2.3. Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA)**

De acordo com o Ministério da Saúde as DTA são doenças causadas pela ingestão de alimentos e/ou água contaminados, sendo essas contaminações de origem bacteriana, parasitária, viral ou tóxica (toxinas naturais e químicas).

De Oliveira e colaboradores (2010) afirmaram que as bactérias são as principais causadoras de surtos DTAs no Brasil e segundo o banco de dados do Ministério da Saúde de 2000 a 2017 . *Salmonella* spp foi responsável por 35% dos surtos de DTAs no Brasil, seguida por *Escherichia coli* com 28,2% dos surtos onde o agente etiológico foi identificado.

Segundo KOTTWITZ et al. 2010, 4,8% dos surtos de salmonelose dentro do estado do Paraná de 1999 a 2008 estavam associados ao consumo de saladas.

Tanto *Salmonella* quanto *E. coli* são bacilos Gram - negativos, compondo a família Enterobacteriaceae que em grande parte integram a microbiota de animais, ligando assim a presença destas em alimentos à contaminação fecal (LEVINSON, W.; JAWETZ, E. 2005).

### **2.3.1. *Escherichia coli***

Mims et al. 2005 expõem a versatilidade da *E. coli* atrelada a sua composição e comportamento, podendo ser benéficas na composição da microbiota intestinal, ou então extremamente agressiva, onde o grau de sua virulência depende de seu mecanismo de ação e através deles as cepas podem ser classificadas em enteropatogênicas (EPEC), enterotoxigênicas (ETEC), enterohemorrágicas (EHEC), enteroinvasivas (EIEC) e enteroagregativas (EAEC).

Strohl et al. 2004, discorrem sobre os risco de cepas EPEC em populações de países subdesenvolvidos, devido a precariedade das condições sanitárias, causando principalmente diarreia líquida através do ataque às células do intestino delgado e grosso, deformando as microvilosidades das células e formando lesões características, em forma de pedestal, nesses órgãos.

Cepas ETECs são as principais causadoras de doenças intestinais por via de água e/ou alimentos contaminados, também são conhecidas como as responsáveis pela diarreia dos viajantes, que resulta na eliminação de diarreia líquida contínua por vários dias (LEVINSON, W.; JAWETZ, E. 2005). As características patológicas citadas atribuem a colonização do intestino delgado e por mediação de enterotoxinas, as cepas causam a hipersecreção de íons de cloreto e água, causando assim a evacuação de líquido em excesso e dificultando a absorção de nutrientes nos tecidos acometidos (STROHL et al. 2004).

As EHECs são conhecidas por serem causadoras desde diarreia leve até uma colite hemorrágica com dor abdominal, diarreia sanguinolenta acompanhada de febre, isso devido a sua capacidade de expressão de toxina Shiga que quando no intestino ligam-se as células da mucosa, inibem a síntese proteica da célula hospedeira e a deforma podendo levar a célula a morte (ALENCAR, 2014). O patógeno mais conhecido e mais virulento das EHECs é o sorotipo O157:H7, o qual é mencionado em vários surtos de infecção alimentar, principalmente pela ingestão de hambúrgueres mal cozidos contaminados, leite cru, sucos não pasteurizados e frutas. (TORTORA et al. 2005).

Cepas EIEC são comparadas a *Shigella* spp. quanto sua virulência, uma vez que invade o epitélio do cólon, causando diarreia sanguinolenta (MURRAY et al. 2006).

As cepas EAEC também causam diarreia aquosa, porém se diferenciam na forma de provocar a patologia, onde utilizam suas fímbrias de adesão para se aglutinar sobre as células do intestino delgado, formando uma espécie de biofilme impedindo assim a absorção de nutrientes e água pelas células hospedeiras (SILVA, 2014). O autor relaciona ainda a persistência dessas bactérias a diarreias crônicas retardo do desenvolvimento em crianças.

Ademais Moura & Fernandes (2010) relatam a atividade de *E. coli* em patologias fora do trato digestivo, como infecções urinárias, meningite neonatal, e, septicemias.

### **2.3.2. *Salmonella* spp**

*Salmonella* spp é a bactéria entérica que mais causa infecções provenientes do consumo de alimentos contaminados (SHINOHARA et al. 2008), vem liderando em casos de surtos de DTAs não apenas no Brasil, De Oliveira e colaboradores (2010) relataram diversos casos confirmados desta enfermidade ao longo do tempo nos EUA, Alemanha, Canadá, Austrália e outros países.

A principal patologia acometida pela *Salmonella* spp. devido a ingestão de água ou alimentos contaminados é a gastroenterite, caracterizada por náuseas, vômito, diarreia (com ou sem sangue), podendo ser acompanhado por febre e contrações abdominais (STROHL et al. 2004).

De forma mais violenta a *Salmonella* Typhi pode desenvolver a febre tifoide que além de apresentar sintomas da gastroenterite é somada a cefaleia e febre alta e septicemia. Outras cepas como *Salmonella* Enterites e *Salmonella* Paratyphi também podem mostrar comportamento mais agressivo que as demais cepas, causando febre entérica (SHINOHARA et al. 2008).

Alguns fatores influenciam quanto ao sintoma do acometido pela bactéria, assim também como o agravamento da patologia, como a dose infecciosa; o sorotipo; e o estado imune do diagnosticado em questão, aponta Strohl e colaboradores (2004).

## 2.4. Óleos essenciais

Óleos essenciais são compostos complexos sintetizados pelas plantas como metabólitos secundários geralmente com a finalidade de proteger a planta de parasitas como insetos e microrganismos. Esses compostos já eram utilizados ao longo da história do homem para aromatizar, dar sabor e conservar alimentos e também no uso medicinal e veterinário (ANDRADE et al. 2014).

Podendo estar localizado em qualquer parte da planta, os óleos essenciais são compostos por diversos componentes químicos, entretanto quando a presença de um destes se supera em proporção as demais é denominado composto majoritário, o qual pode ser influenciado em qualidade e quantidade dependendo da sazonalidade, geografia, estresse da planta ou forma de extração deste óleo (SOUZA, 2015).

O consumo dos óleos essenciais vem crescendo cada vez mais no mercado farmacêutico seja pelo fator aromático utilizado nas perfumarias e cosméticos ou pelo fator medicinal, onde soma-se cada vez mais trabalhos reforçando a atividade antimicrobiana destes (RAUT& KARUPPAYIL, 2014).

Pereira e colaboradores (2014), associaram óleos essenciais de plantas condimentares juntamente com solução desinfetante para otimizar o processo de desinfecção na indústria de alimentos, obtendo bons resultados na inibição de *E. coli* frente ao óleo de cravo da Índia.

Além disso, Soares et al. (2009), Botre et al. (2010), e Borges et al. (2013) dentre outros apresentam bons resultados no emprego de óleos essenciais em

embalagens de alimentos, onde atuam tanto como inibidores microbianos quanto conservantes naturais.

Outro fator que influencia no aumento da procura destes óleos é a retomada de compostos naturais que combatam bactérias resistentes a compostos químicos, causado pelo uso indiscriminado de antibióticos (PEREIRA et al. 2014).

### **3. Materiais e métodos**

Todas as análises foram realizados no Laboratório de Bacteriologia, situado no Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Instituto de Biologia, da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) ,Campus Capão do Leão.

#### **3.1. Processo de isolamento**

Foram analisadas 25 amostras de alimentos minimamente processados à base de frutas e legumes. Estes alimentos foram adquiridos em mercados e feiras locais, obtidos de acordo com a sua disponibilidade diária, oferecidos embalados obedecendo a data de vencimento e transportados até o laboratório para a realização das análises. Sendo os métodos de análise utilizados realizados segundo Silva et al (1997) e Vermelho e colaboradores (2006).

##### **3.1.1. Contagem de coliformes a 45°C por número mais provável (NMP) e isolamento de *Escherichia coli*.**

Para o procedimento de isolamento de *E. coli* e contagem de Número Mais Provável de coliformes a 45°C iniciou-se com o teste presuntivo. Primeiramente com o auxílio de uma balança de precisão, de pinça e placas de petry estéreis foram pesadas 25g do alimento analisado, a fim de serem homogeneizados com 225ml de água peptonada a 0,1% em um liquidificador previamente esterilizado com álcool 70%, obtendo assim a diluição a  $10^{-1}$ . Posteriormente foram realizadas diluições decimais, retirando 1 ml da primeira diluição e adicionando em um tubo com 9 ml de água peptonada a 0,1%, atingindo assim a diluição  $10^{-2}$ , e assim sucessivamente até alcançar a diluição a  $10^{-6}$ .

Após, foi pipetado 1ml de cada diluição em 3 tubos contendo 10ml de Caldo Lactosado (Isofar ®), com tubos de Durhan a fim de visualizar a produção de gás decorrente da fermentação da glicose. Todos os tubos foram para a incubadora a 36°C por 48 horas.



Após a incubação foram observados os tubos que apresentaram como positivas, e desses foram retiradas 2 alçadas do cultivo e inoculadas em tubos contendo Caldo EC (Himedia ®), com tubos de Durhan e então incubados a 45°C em banho-maria por 48 horas, juntamente de um controle positivo e um negativo. Os tubos com fermentação positiva foram utilizados para calcular o Número Mais Provável (NMP), utilizando a tabela de Hoskins.

Para o isolamento e confirmação de *E. coli*, foi retirada uma alçada dos tubos de Caldo EC que apresentaram fermentação positiva e semeada em uma placa de Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) (ISO FAR ®), e incubada a 36°C por 24 horas. As colônias características (colônias rosa com centro negro secas ou mucosas, com ou sem brilho verde metálico) foram replicadas para a realização dos testes bioquímicos como teste Indol, Vermelho de Metila (VM), Voges-Proskauer (VP) e do Citrato (INViC).

Para o teste Vermelho de Metila foi inoculado uma colônia em Caldo MR-VP (ISO FAR ®), e aguardado 72 horas de incubação a 36°C, e então adicionadas cinco gotas de vermelho de metila e esperado o desenvolvimento da cor vermelha no meio. Quanto ao teste Voges - Proskauer foi utilizado o mesmo caldo MR-VP (ISO FAR ®), para fazer o inóculo e então foi incubado por 24 horas, após foi retirado 1ml do inóculo em um tubo limpo e adicionado 0,6ml de  $\alpha$ -naftol a 5% e 0,2ml de KOH a 40% respectivamente, após 10 minutos o resultado esperado é o resultado negativo tornando o inóculo bege ou leve marrom.

No teste Indol foi utilizado um tubo de Ágar SIM semi-sólido (MERCK ®) (sulfeto – indol – motilidade) onde uma colônia suspeita foi inoculada através de uma agulha no meio, e assim foi incubada a 36°C por 24 horas, após esse período foi possível observar a capacidade de motilidade bacteriana através da turbidez ou não do meio, assim como a produção de H<sub>2</sub>S com o escurecimento do meio. Ademais foi adicionado 15 gotas de reativo de Kovac's no tubo com o inóculo e a reação esperada foi a coloração rosa na superfície de contato com o meio.

O teste de citrato foi feito com o meio de Ágar Citrato de Simmons (Oxoid ®), onde com a mesma agulha que inoculou no meio SIM foi utilizada para fazer uma estria no meio de cultura. A incubação ocorreu a 36°C de 24 a

48 horas, após esse período o esperado para a confirmação de *E. coli* é que o meio continue verde, ou seja, dê resultado negativo para teste de citrato.

### 3.1.2. Isolamento e identificação de *Salmonella* spp.

Utilizando uma balança de precisão com o auxílio de pinça e placa de petry estéreis, foram pesados 25g do alimento, e homogeneizado em 225ml de Caldo Lactosado (Isofar ®) em um liquidificador previamente estéril com álcool 70%. Após a homogeneização o pH foi ajustado em 6,8 utilizando NaOH ou HCl quando necessário, e incubado a 36°C por 24 horas.

Após o período de incubação, um inóculo de 0,1ml deste cultivo foi retirado e colocado em um tubo de Caldo Rappaport (Acumedia ®) e 1ml em um tubo com Caldo Tetrionato (Acumedia ®) contendo 0,2ml de solução de Iodo e 0,1ml de solução de verde malaquita Então os tubos foram incubados por mais 24 horas a 37°C.

Após o período de incubação foi retirada uma alçada de ambos os caldos e plaqueada em Ágar Hektoen Enteric (HE) (Kasvi ®) e Ágar Xilose Desoxicolato (XLD) (Kasvi ®) e incubados a 36°C por mais 24 horas.

Após a incubação, as colônias típicas de *Salmonella* em Ágar HE (colônias transparentes ou negras, verde-azuladas, com ou sem centro negro, ou cor salmão e sem transparências se for fermentadora de lactose ou sacarose ) e em Ágar XLD (colônias transparentes ou negras, com ou sem centro negro ou amarelas com ou sem centro negro), foram semeadas para Lysine Iron Agar (LIA) (Oxoid ®), Ágar Triple Sugar Iron (TSI) (Himedia ®) e caldo Uréia (Vetec ®) para a realização dos testes bioquímicos.

Em meio LIA a colônia foi inoculada em dois furos no próprio meio feito com uma agulha contendo a colônia, e incubado por 24 horas a 36°C e a reação esperada é a permanência da cor púrpura.

Foi feita a semeadura em ágar TSI através de uma estria na superfície do meio em tubo inclinado e inserção da alça de cultura até a base do meio com a colônia a ser testada. Após a incubação a 36°C por 24 horas a reação da amostra positiva obtida foi a modificação das cores do meio para amarelo e escurecimento do ágar na base e avermelhado na superfície.

Ademais foi feita a dispersão da colônia em caldo Uréia para verificar a ação da enzima urease e incubado juntamente aos demais testes bioquímicos.

Por fim foi feito o teste sorológico para pesquisa do antígeno somático, onde foi feita uma suspensão concentrada da colônia em salina em uma lâmina de vidro e acrescentada uma gota de Soro *Salmonella* Somático Polivalente (Probac do Brasil®). Após 2 minutos foi observada a presença de grumos, confirmando a presença de *Salmonella* spp.

Após a confirmação bioquímica e sorológica, os isolados bacterianos foram armazenados em uma mistura de leite em pó e congelados para conservação e manutenção.

### **3.2. Avaliação da atividade antibacteriana**

Após o procedimento de isolamento e identificação das espécies bacterianas propostas, as amostras foram repicadas em Ágar BHI inclinado e incubadas a 36°C por 24h. As colônias foram repicadas para a obtenção de massa bacteriana, para viabilizar a utilização dos óleos essenciais nos próximos testes. Foram realizadas colorações de Gram para avaliar a pureza dos inóculos.

#### **3.2.1. Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

A CIM foi avaliada como sendo a menor concentração do óleo essencial (OE) com capacidade de inibir o crescimento microbiano. Para a sua determinação, foi utilizada a técnica de Microdiluição em Caldo. Foram utilizados oito óleos essenciais (OE) de espécies diferentes, comercializados pela empresa FERQUIMA®, para a realização da CIM frente as cepas isoladas do alimentos minimamente processados. Os óleos testados foram copaíba (*Copaifera langsdorffii*), tangerina (*Citrus reticulata* v. *tangerine*), cedro (*Cedro atlas*), pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius*), eucalipto (*Eucalipto citriodora*), cardamomo (*Elettaria cardamomum*), manjerição (*Ocimum basilicum*) e, cravo botão (*Eugenia caryophyllus*).

O teste de CIM foi feito segundo a técnica descrita pela National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2017).

Primeiramente foi preparada uma suspensão bacteriana, com uma cepa a partir do crescimento de 24 horas, de acordo com a escala 0,5 Mac Farland correspondente a aproximadamente  $1,5 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$ . Após, foi preparado o inóculo bacteriano adicionando  $50 \mu\text{L}$  da suspensão em  $4,950 \mu\text{L}$  de Caldo BHI (Brain Heart Infusion, Kasvi®).

Foi utilizado uma placa de cultura de 96 poços, organizada em colunas de 1 a 12, e linhas de A a H, como é demonstrado da figura 1.

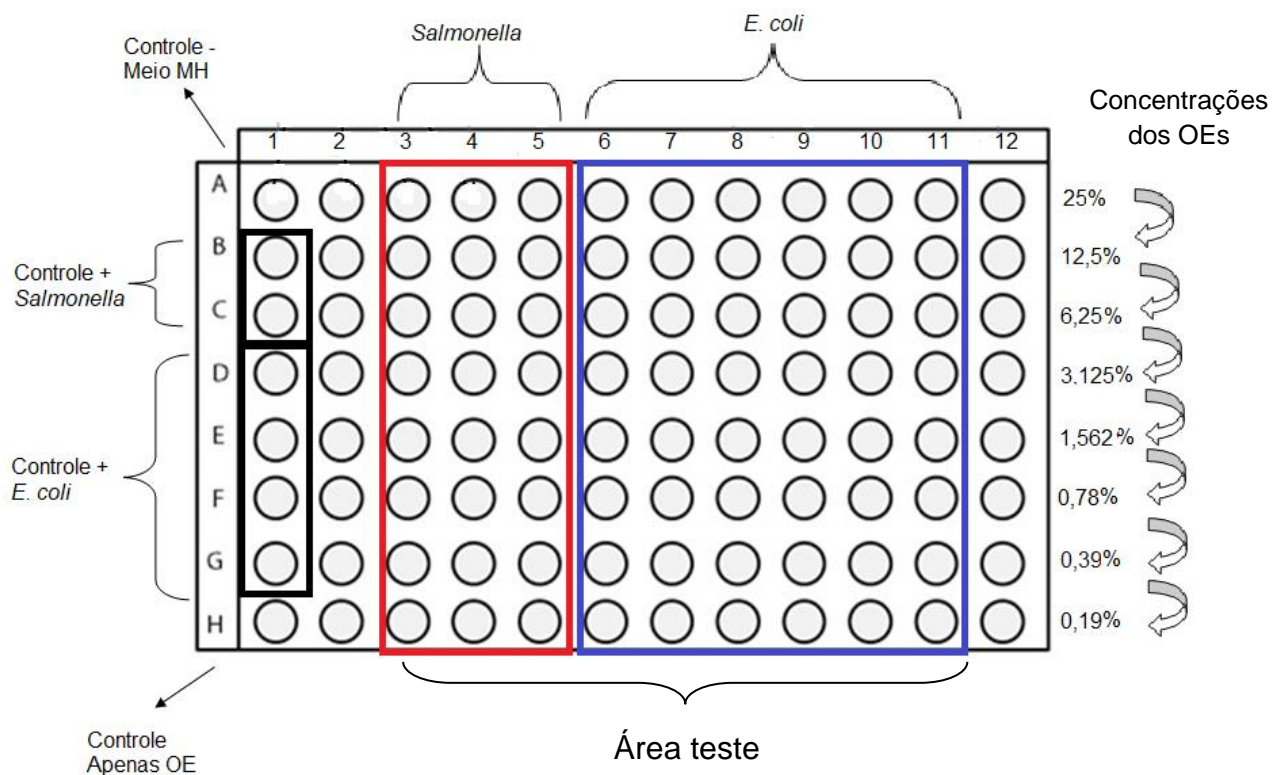


Figura 1: Esquema utilizado na realização do teste de Concentração Inibitória Mínima em placa de 96 cavidades; destacado em vermelho a área teste de *Salmonella*; destacado em azul a área teste de *E. coli*.

Foi adicionado em toda a área teste  $50 \mu\text{L}$  de BHI acrescido com 1% do emulsificante Tween 80 e então feita a diluição no sentido da linha A para H, onde foi adicionado  $50 \mu\text{L}$  de OE na linha A dentro da área teste, homogeneizado e então retirado  $50 \mu\text{L}$  e transferido para a linha B, homogeneizado, retirado  $50 \mu\text{L}$  e transferido para a linha C e assim sucessivamente até a linha H que após a homogeneização foi retirado  $50 \mu\text{L}$  e descartado. Esse processo garante a

solubilização do óleo no meio e também a sua diluição em concentrações que variam de 25 a 0,19%.

Posteriormente foram adicionados os inóculos bacterianos previamente preparados, sendo 50 µL em cada poço dentro da área teste. Os testes foram realizados em triplicata, onde nas colunas de 3 a 5 adicionou-se o inóculo de *Salmonella*, nas colunas de 6 a 11 o inóculo de *E. coli*.

Na coluna 1 se mantiveram os controles, onde na linha A foi adicionado 50 µL de caldo BHI como controle negativo. Nas linhas B e C foi adicionado 50 µL do inóculo de *Salmonella*, nas linhas D a G o inóculo de *E. coli*, como controles positivos da viabilidade dos isolados e por fim na linha H foi adicionado 50 µL do OE a ser testado, como controle positivo da pureza do óleo.

Após esse processo, as placas foram incubadas em estufa a 36°C por 24 horas.

A avaliação dos resultados foi feita a partir da adição de 20µL de Cloreto de 2,3,5 TrifenilTetrazólio a 0,5% em todas as cavidades sendo as placas incubadas a 36°C por 20min. A alteração na coloração (de transparente a vermelho), é indicativo de atividade metabólica bacteriana, comprovando a ausência da atividade biológica dos óleos essenciais testados (como demonstrado na figura 2).

### **3.2.2. Concentração Bactericida Mínima (CBM)**

Com base nos resultados da CIM foi determinada a CBM, a qual se refere à menor concentração do óleo essencial capaz de impedir o crescimento microbiano em meio de cultura sem a presença do óleo.

Para isso foi utilizada novamente a técnica descrita na National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2007), onde foi retirado alíquotas de 5µL de cada poço que apresentaram inibição bacteriano, semeado em Agar Muller Hinton e incubado a 36°C por 24 horas.

Nos casos em que não houve crescimento bacteriano no meio de cultivo, indicou que os óleos essenciais testados não apresentaram atividade bacteriostática e sim bactericida.

A CBM não foi realizada nos casos em que o OE não apresentou atividade biológica na CIM.

## 4. Resultados e discussão

### 4.1. Isolados a partir dos alimentos minimamente processados

Das 25 amostras analisadas apenas duas (8%) estavam contaminadas e não atenderam a regulamentação da ANVISA. Das duas amostras contaminadas uma indicou a presença de *Salmonella* spp. e outra de coliformes a 45°C contabilizando  $7 \times 10^3$  NMP, ultrapassando a máxima permitida pela ANVISA que é de  $10^2$  bactérias g<sup>-1</sup> de alimento o que inviabiliza as duas amostras para o consumo humano.

As amostras contaminadas continham hortaliças para saladas e nenhuma amostra composta de frutas apresentou contaminação. Pinheiro e colaboradores (2005) discorre sobre o baixo pH de salada de frutas que pode influenciar no crescimento bacteriano.

Smanioto e colaboradores (2009) demonstraram em suas análises de 30 amostras de frutas e hortaliças minimamente processadas ausência de *Salmonella*, porém, 13% ultrapassaram os valores permitidas pela ANVISA para coliformes a 45°C, ultrapassando nossos resultados.

Da Silva e colaboradores (2007) averiguaram a carga microbiana de vegetais prontos para consumo em Porto Alegre, obtendo de 28,6% das amostras contaminadas por *E. coli* e destas, quatro apresentaram contagem acima da permitida pela ANVISA. Sendo estes resultados superiores aos encontrados em nossos estudos.

Bruno e colaboradores (2005) avaliaram a qualidade de alimentos minimamente processados em Fortaleza e das 30 amostras de hortaliças/ tubérculos e frutas analisadas, 33% apresentavam contaminação por coliformes a 45°C acima do permitido sendo que, 84% continha *Salmonella* spp. Ainda em Fortaleza Pinheiro e colaboradores (2005) fizeram um trabalho equivalente com amostras de frutas e, constataram que 25% estavam contaminadas com *Salmonella* spp e 28% continham contaminação por coliformes a 45°C acima do permitido. Resultados superiores aos encontrados em nosso trabalho, onde detectamos que 8% das amostras investigadas apresentaram *Salmonella* spp. e *E. coli*. visto que as taxas de

contaminação bacteriana de alimentos minimamente processados se mostrou maior em estados de regiões mais quentes, podemos supor que a temperatura ambiente mais alta beneficia tanto a *E. coli* quanto a *Salmonella* que tem como temperatura ótima de crescimento na faixa dos 36°C.

Nossas amostras foram analisadas durante um ano, as duas amostras contaminadas foram obtidas uma no mês de Setembro de 2017 e outra em Maio de 2018, meses de temperatura amena na região, somado a isso estas mesmas amostras estavam em condições de refrigeração, o que nos leva a supor que as contaminações podem ser provocadas pela falta de higiene dos alimentos ou por contaminação cruzada.

#### 4.2. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) dos óleo essenciais

Os oito OE demonstraram atividade biológica de forma distintas, como demonstrado da tabela 1, onde observamos desde a ausência de atividade, como o OE de *Cedro atlas* (figura 2), até a atividade bactericida em qualquer concentração, como o OE de *Eugenia caryophyllus* (figura 5).

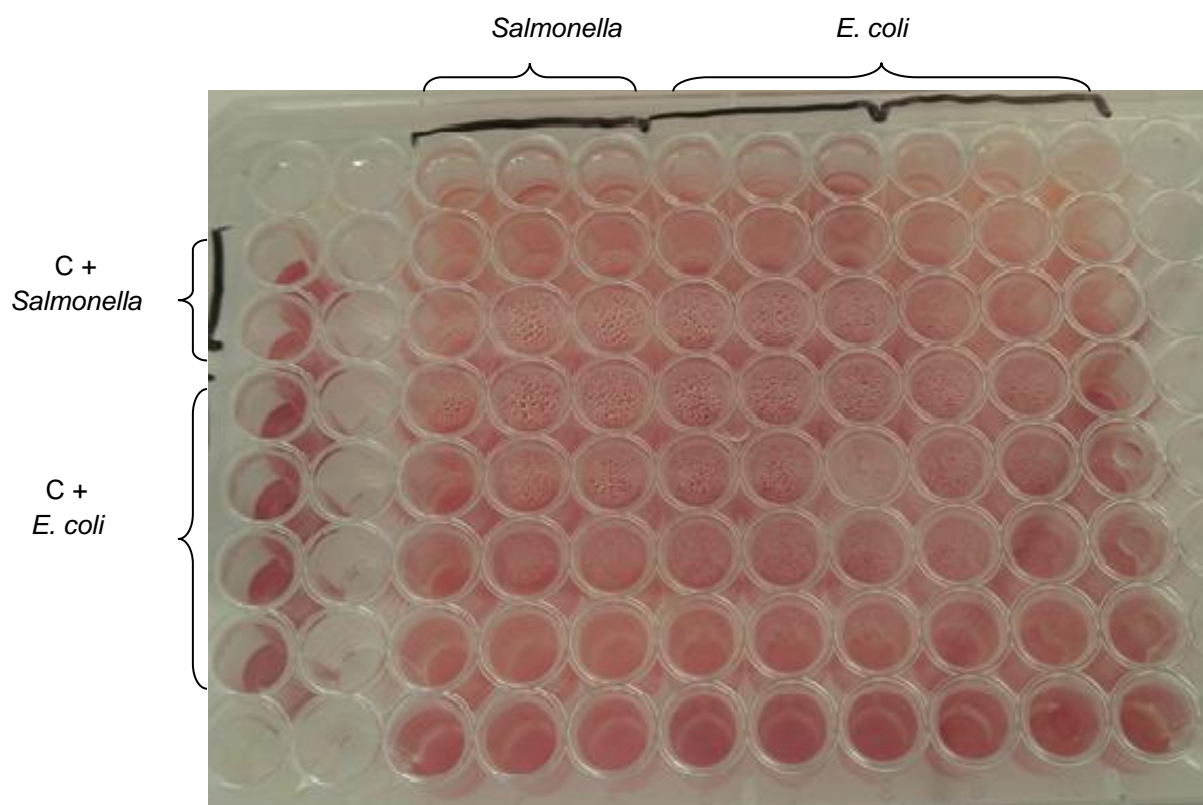


Figura 2: Avaliação de concentração inibitória mínima de óleo essencial de cedro frente a *Salmonella* e *E. coli* isoladas de alimentos minimamente processados



Tabela 1 - Atividade biológica de óleos essenciais através dos testes de concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima.

<b>Atividade biológica do óleos essenciais</b>		
Óleo essencial	CIM mg/mL	CBM mg/mL
<i>Copaifera langsdorffii</i>	-	-
<i>Citrus reticulata v.tangerine</i>	-	-
<i>Cedro atlas</i>	-	-
<i>Schinus terebinthifolius</i>	258	-
<i>Eucalipto citriodora</i>	28	58
<i>Elettaria cardamomum</i>	27	27
<i>Ocimum basilicum</i>	6,72	6,72
<i>Eugenia caryophyllus</i>	1,9	1,9

A ação biológica da maioria dos OE testados em nosso trabalho frente a *Salmonella* e *E. coli* foram surpreendentemente equivalentes, uma vez que em outros trabalhos de análises inibitórias com óleo essenciais não demonstram os mesmo resultados, como nos estudos de Valleriano et al. (2012) onde *E. coli* e *Salmonella* reagiram de forma distintas frente a atividade biológica de óleos essenciais.

Andrade e colaboradores (2014) buscaram a concentração inibitória mínima, através do método de difusão em ágar, de óleo essencial de copaíba frente a *E. coli* padrão ATCC 25922 e de isolados clínicos, e obtiveram resultados semelhantes aos nossos, não obtendo resposta inibitória do óleo. Podemos atribuir à equivalência dos dados aos nossos devido o método de extração do óleo essencial ser o mesmo, destilação a vapor, logo o calor na extração pode ter inviabilizado componentes majoritários uma vez que há outros trabalhos, como Pieri et al. (2011 e 2012) e Yamaguchi & Garcia (2012), que evidenciam a atividade antibacteriana deste óleo.



Figura 3: Avaliação de concentração inibitória mínima de óleo essencial de cravo frente a *Salmonella* e *E. coli* isoladas de alimentos minimamente processadas.

O limoneno é um dos principais compostos majoritários de plantas cítricas, como a tangerina (*Citrus reticulata* v. *tangerine*), onde a sua atuação frente as células bacterianas é o comprometimento da função permeabilidade seletiva da membrana (MILLEZI et al. 2013). Visto isso, Oliveira e colaboradores (2017) e Santos et al. (2016) observaram a ação do óleo essencial de tangerina (*Citrus reticulata* v. *tangerine*) na capacidade de inibir cepas de *Salmonella* spp. e *E. coli* em concentrações de até  $40 \mu\text{LmL}^{-1}$  de acordo com. Entretanto nossos resultados não apontaram ação biológica deste OE.

Gilbert & Favoreto (2011) apresentaram estudos que comprovam a ação antimicrobiana de óleos essenciais de diversas partes da planta de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius*), entretanto Gerhrke e colaboradores (2007), obtiveram resultados parecidos com os nossos, onde a sensibilidade de cepas de *E. coli* e *Salmonella* spp. foram observadas apenas em concentrações altas do óleo essencial do fruto da pimenta rosa. Dannenberg (2017) observou em seu estudo com OE de pimenta rosa a maior atividade em bactérias Gram-positivas, isso devido a maior facilidade de entrada das moléculas do OE pela camada de peptidoglicano das Gram-positivas do que pela camada dupla de lipopolissacarídeos das Gram-negativas, sendo assim, necessitando de concentrações mais altas de OE para a atuação antibacteriana em bactérias Gram-negativas.

Trabalhos de atividade biológica de *Eucalypto citriodora*, como o de Antunes (2016), atribuem sua ação ao composto majoritário citronelal, que acordo com Millezi e colaboradores (2013) e atua de forma semelhante ao composto limoneno, ou seja, de forma tóxica na membrana da célula interferindo na permeabilidade seletiva. Desta forma podemos vincular a atividade do composto majoritário aos nossos resultados onde houve a inibição do crescimento, porém, não houve ação bactericida.

Pereira e colaboradores (2014) avaliaram a sensibilidade de cepas Gram-negativas e Gram-positivas frente a óleos essenciais de cardamomo e cravo botão, e os mesmos apresentaram atividades diferentes às nossas, onde a cepa *E. coli* ATCC 25922 foi inibida, porém *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, se mostrou resistente. Desta forma vemos que mesmo cepas da mesma espécie podem responder de formas distintas quando são de origens diferentes, ademais Burt (2004), fomenta os vários motivos que intervêm na composição química dos óleos essenciais mesmo que da mesma espécie, os quais podem ser a sazonalidade da planta quando colhida; a geografia em que a planta se encontra ou a forma como foi extraído o óleo. Sendo assim, esclarecendo resultados dispares.

Martins, 2010; Martins et al. 2010 e Aquino et al. 2010 demonstram a atividade inibidora do óleo essencial de manjeriço (*Ocimum basilicum*) em pequenas concentrações quanto a cepas patogênicas. Já Silva (2011) não encontrou ação inibitória da multiplicação de *Salmonella* spp., diferente dos dados de nosso estudo, onde este óleo apresentou atividade bactericida sobre o isolado de *Salmonella* spp. Em ambos os trabalhos a forma de extração dos OEs foram as mesmas que em nosso trabalho, destilação a vapor das folhas da planta, logo podemos atribuir tanto aos fatores genéticos, geográficos ou fisiológicos em que a planta extraída se encontrava, como Luz e colaboradores (2014) demonstram em seu trabalho.

Seguindo a mesma linha, Hussain e colaboradores (2008) obtiveram dados de que a composição química dos óleos essenciais de manjeriço oscila de acordo

com a estação, interferindo na sua atividade bacteriana, podendo ser um fator que explique a diferenças de respostas de trabalhos com a mesma metodologia.

O óleo essencial de cravo botão apresentou o melhor resultado de inibição frente as bactérias isoladas em relação aos demais óleos testados, semelhante aos resultados de Pereira et al. (2014) que através do mesmo óleo demonstrou inibição de *E. coli*. Podemos atribuir a atividade biológica de seu componente majoritário eugenol que atua na degeneração das proteínas componentes da membrana celular das bactérias causando dano nesta e conseqüentemente na morte da bactéria (LINARD, 2008).

## **5– Conclusão**

Conclui-se que duas das amostras de alimentos minimamente processados estavam contaminadas com *Salmonella* spp. e *E coli*. Acima do limite preconizado pela legislação, oferecendo risco a saúde do consumidor.

Os OEs de copaíba, cedro e tangerina não apresentaram atividade biológica frente aos isolados bacterianos obtidos. Enquanto que o OE eucalipto apresentou atividade inibitória, e a ação bactericida foi evidenciada pelos OEs de cardamomo, manjeriço e cravo frente às bactérias investigadas.

Desta forma é necessário a continuação de estudos com o intuito de desenvolver protocolos para o emprego dos óleos essenciais na indústria alimentícia a fim de controlar o desenvolvimento de bactérias patogênicas e, além de garantir um produto de melhor qualidade e também segurança alimentar ao consumidor.

## Referências

ANTUNES, Mariana D. **Produção de fibras ultrafinas de zeína incorporadas com complexo de inclusão de  $\beta$  – ciclodextrina e óleo essencial de eucalipto (*Eucalypto citriodora*) com atividade antimicrobiana, pela técnica de electrospinning**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Pelotas, 2016.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada - **RDC nº 12**, de 2 de janeiro de 2001. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC\\_12\\_2001.pdf/15ffd6-3767-4527-bfac-740a0400829b](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffd6-3767-4527-bfac-740a0400829b) , acessado em 13 de Dezembro de 2017.

ALVARENGA, A. L. B.; PAULILLO, L. F. de O. e; TOLEDO, J. C. de. Qualidade e segurança de vegetais minimamente processados: proposta de estruturas de governança entre os agentes da cadeia e os sinais da qualidade. **Gest. Prod.**, São Carlos, v. 21, n. 2, p. 341-354, 2014.

ANDRADE, B. F. M. T.; BARBOSA, L. N.; PROSBT, I. da S.; FERNANDES JÚNIOR, A. Antimicrobial activity of essential oils. Journal of essential oil research, vol. 26, no. 1, 2014

AQUINO, L. C. L. de; SANTOS, G. G.; TRINDADE, R. de C.; ALVES, J. A. B.; SANTOS, P. O.; ALVES, P. B.; BLANK, A. F.; CARVALHO, L. M. de. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de erva-cidreira e manjeriço frente a bactérias de carnes bovinas. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v. 21, n. 4, p. 529-535, out./dez. 2010

BERGAMINI, A. M. M.; CAPUANO, D. M.; OKINO, M. H. T.; OLIVEIRA, C. A. D.; OLIVEIRA, M. A.; SILVA, A. A. M. C. C. e; RIBEIRO, E. G. A.; TAKAYANAGUI, A. M. M.; TAKAYANAGUI, O. M. Análise da cadeia de produção de verduras em Ribeirão Preto, SP **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 39(2):224-226, mar-abr, 2006.

BORGES, C. D.; MENDONÇA, C. R. B.; ZAMBIAZI, R. C.; NOGUEIRA, D.; PINTO, E. M.; PAIVA, F. F. Conservação de morangos com revestimentos à base de goma xantana e óleo essencial de sálvia. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 29, n. 5, p. 1071-1083, Sept./Oct. 2013.

BOTRE, D. A.; SOARES, N. de F. F.; ESPITIA, P. J. P.; SOUSA, S. de; RENHE, I. R. T. Avaliação de filme incorporado com óleo essencial de orégano para conservação de pizza pronta. **Rev. Ceres**, Viçosa, v. 57, n.3, p. 283-291, mai/jun, 2010.

BRUNO, Laura M.; QUEIROZ, Ana Amélia. M. de; ANDRADE, Ana Paula C de; VASCONCELOS, Natália M. de; BORGES, Maria de F. Avaliação microbiológica de hortaliças e frutas minimamente processadas comercializadas em Fortaleza (CE). **B.CEPPA**, Curitiba, v. 23, n. 1, p. 75-84, jan./jun. 2005

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

DANNEMBERG, Guilherme da S. **Óleo essencial de pimento rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi): atividade antimicrobiana e aplicação como component ativo em filme para bioconservação de alimentos.** 2017. 122f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Pelotas, 2017.

DE ALENCAR, Bruna M. **Avaliação da frequência de bactérias causadoras de gastroenterite em pacientes ambulatoriais do Distrito Federal.** 2014. 47f. Monografia (Graduação em Farmácia) – Universidade de Brasília, 2014.

DE PAULA, N. R. F.; CARVALHO, R. A. ;PICCOLI, R.H.; RODRIGUES, L. J.; VILLAS-BOAS, E. V. de B. Quality of fresh-cut produce commercialized on supermarket shelves in the cities of Lavras-MG, Brasília-DF, and São Paulo-SP. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 33, n. 1, p. 219-227, jan./fev., 2009.

DA SILVA, Sílvia R. P.; VERDIN, Sílvia E. F.; PEREIRA, Dariane C.; SCHATKOSKI, Aline M.; ROTT, Marilise B.; CORÇÃO, Gertrudes. Microbiological quality of minimally processed vegetables sold in Porto Alegre, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, vol. 38, n. 4, Oct./Dec. 2007.

DE OLIVEIRA, Ana Beatriz A.; de PAULA, Cheila M. D.; CAPALONGA, Roberta; CARDOSO, Marisa R. de I.; TONDO, Eduardo C. Doenças transmitidas por alimentos, principais agentes etiológicos e aspectos gerais: uma revisão. **Rev HCPA** 2010;30(3):279-285.

DE SOUZA, TENILLE R. **Óleos essenciais no controle de células planctônicas e sésseis de *Staphylococcus aureus*.** 2015. 71f. Dissertação (Mestre Microbiologia Agrícola) Universidade Federal de Lavras – MG. 2015.

FERREIRA, Cláudia C.; GREGÓRIO, Eric L.; COSTA, Jéssica D.; PAULA, Rubiana B. O. de; ARAUJO NETA, Haydée A. G. de; FONTES, Mariana D. Análise de coliformes termotolerantes e *Salmonella* sp. em hortaliças minimamente processadas comercializadas em Belo Horizonte- MG. **HU Revista**, Juiz de Fora, v. 42, n. 4, p. 307-313, nov./dez. 2016.

GEHRKE, I.T.S.; STUKER, C.Z.; STOLZ, E.D.; MOREL, A.F. 2007 - Identificação dos principais constituintes do óleo essencial dos frutos de (*Schinus terebinthifolius* Raddi) da região noroeste do RS e atividade antimicrobiana. (UNIJUI e UFSM de RGS). **30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, PN-148, Águas de Lindóia.

HUSSAIN, A. I.; ANWAR, F.; SHERAZI, S. T. H.; PRZYBYLSKI, R. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. **Food Chemistry** 108 (2008) 986 – 995.

International Fresh-Cut Producers Association.

Disponível em: <https://www.unitedfresh.org/?s=minimally+processed>

acessado em setembro de 2018

LEVINSON, Warren; JAWETZ, Ernest. **Microbiologia médica e imunologia**. 7ª ed. Porto Alegre – RS: Artmed, 2005. p. 127 – 135.

KOTTWITZ, Luciana B. M.; OLIVEIRA, Tereza Cristina R. M.; ALCOCER, Iliana; FARAH, Sonia Maria de S. S.; ABRAHÃO, Wanda S. M.; RODRIGUES, Dalia dos P. Avaliação epidemiológica de surtos de salmonelose ocorridos no período de 1999 a 2008 no Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, Maringá, v. 32, n. 1, p. 9-15, 2010

LINARD, Cybelle F. B. M. **Estudo do efeito antinociceptivo do eugenol**. 2008. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) Universidade Federal do Ceará, 2008.

MARTINS, A. G. L. de A. **Atividade antimicrobiana de óleos essenciais do manjeriço (*Ocimum basilicum* Linnaeus) e do gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) frente a linhagens de *Escherichia coli* enteropatogênicas isoladas de hortaliças**. 2010. 110f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal da Paraíba, 2010.

MARTINS, A. G. L. de A.; NASCIMENTO, A. R.; MOUCHREK FILHO, J. E.; MENDES FILHO, N. E.; SOUZA, A. G.; ARAGÃO, N. E.; SILVA, S. V. de. Atividade antibacteriana do óleo essencial do manjeriço frente a sorogrupos de *Escherichia coli* enteropatogênica isolados de alfaces. **Ciência Rural**, Santa Maria, 2010.

MILLEZI, A. F.; BAPTISTA, N. N.; CAIXETA, D. S.; ROSSONI, D. F.; CARDOSO, M. G.; PICCOLI, R. H. Caracterização e atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.15, n.3, p.373-379, 2013.

MIMS, Cedric; DOCKRELL, Hazel M.; GOERING, Richard V.; ROITT, Ivan; WAKELIN, Derek; ZUCKERMAN, Mark. **Microbiologia médica**. 3ª ed. Rio de Janeiro - RJ : Elsevier, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/doencas-transmitidas-por-alimentos>



MINISTÉRIO DA SAÚDE:

<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/julho/02/Apresentacao-Surtos-DTA-Junho-2018.pdf>

MORETTI, Celso L. **Manual de processamento mínimo de frutas e hortaliças**. Brasília – DF: Embrapa Hortaliças, 2007.

MOURA, Lorena B de; FERNANDES, Maiára G. A Incidência de Infecções Urinárias Causadas por *E. coli*. **Revista Olhar Científico** – Faculdades Associadas de Ariquemes – V. 01, n.2, Ago./Dez. 2010

MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael A. **Microbiologia médica**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. p. 318 – 322.

CLSI. M100: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing 27<sup>th</sup> Edition. Supplement M02-A12, M07-A10 and M11-A18, Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017.

NASCIMENTO, E. F. do; MORETTI, C. L.; ZUCHETTO, M. C.; MATTOS, L. M. Avaliação da temperatura de comercialização de hortaliças minimamente processadas no mercado varejista do Distrito Federal. In: Congresso Brasileiro de Olericultura, 43., 2003, Recife. **Anais...** Botucatu: Sociedade de Olericultura do Brasil, 2003. p.195.

OLIVEIRA, F. S.; LEÃO, L. L.; PRATES, R. P.; PAIM, C. de M.; SOARES, L. J. F.; FARIAS, P. K. S. Ação dos essenciais de *Citrus aurantium* var. *dulcis*, *Passiflora edulis* e *Citrus reticulata* v. tangerine frente a bactérias patogênicas. **Anais do III Congresso norte mineiro de infectologia**, 2017; 12-73.

PEREIRA, A. de A.; PICCOLI, R. H.; BATISTA, N. N.; CAMARGOS, N. G.; OLIVEIRA, M. M. M. de. Inativação termoquímica de *Eschechia coli* e *Salmonella enterica* Enteritidis por oleos essenciais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.44, n.11, p. 2022-2028, nov, 2014.

PIERI, F.A.; SILVA, V.O.; SOUZA, C.F.; COSTA, J. C. M.; SANTOS, L.F.; MOREIRA, M. A. S. Antimicrobial profile screening of two oils of *Copaifera* genus. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.64, n.1, p.241-244, 2012

PIERI, F.A.; SOUZA, C.F.; COSTA, J. C. M.; BARRERO, M. A. O.; ESPESCHIT, I. F.; SILVA, V.O.; MOREIRA, M. A. S. Inibição de *Escherichia coli* de leite mastítico pelo óleo de copaíba. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, suplemento 1, p. 1929-1934, 2011

PINHEIRO, Neuma M. de S.; FIGUEIREDO, Evânia A. T. de; FIGUEIREDO, Raimundo W. de; MAIA, Geraldo A.; SOUZA, Paulo H. M. de; Avaliação da qualidade microbiológica de frutos minimamente processados comercializados em supermercados de Fortaleza. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v. 27, n. 1, p. 153-156, Abril 2005

RAUT, J. S.;KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products** 62 (2014) 250–264.

SANTOS, A. O.; FREIRE, J. A. de S.; CARVALHO, T. D. de; BARBOSA, T. C.; PRATES, R. P.;SILVA, J. C. R. L.; FARIAS, P. K. S. Atividade antibacteriana e antioxidante de óleos essenciais cítricos com potencialidade para inclusão como aditivos em alimentos. *Cad. Ciênc. Agrá.*, v. 8, n. 3, p. 15-21, 2016.

SHINOHARA, Neide K. S.; de BARROS, Viviane B.; JIMENEZ, Stella M. C.; MACHADO, Erilane de C. L.; DUTRA, Rosa A. F.; de LIMA FILHO, José L. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência & Saúde Coletiva**, 13(5):1675-1683, 2008.

SMANIOTO, Taline Fernanda; PIROLO, Nathália J.; SIMIONATO, Eliane Maria R. S.; ARRUDA, Maria Cecília. Qualidade microbiológica de frutas e hortaliças minimamente processadas. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 68(1):150-4, 2009.

SILVA, E. de O.; BASTOS, M. do S. R.; WURLITZER, N. J.; BARROS, Z. de J.; MANGAN, F. Minimal Processing fruit and vegetables. In: **Advances in fruit processing Technologies**. Taylor & Francis Group, 2012, p.217-228.

SILVA, Luis A da; **Caracterização das cepas de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) isoladas de crianças com gastroenterite aguda na região de Porto Velho – RO**. 2014. 90f. Dissertação (Mestrado em Biologia Experimental) – Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2014.

SILVA, M. G. F. da. **Atividade antioxidante e antimicrobiana in vitro de óleos essenciais e extratos hidroalcóolicos de manjerona (*Origanum majorana*) e manjeriço (*Ocimum basilicum* L.)**. 2011. 70f. Monografia (Graduação em química). Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2011.

SILVA, Neusely da; JUNQUEIRA, Valéria C. A.; SILVEIRA, Naliane F. A. **Manual de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo - SP: Livraria Varela, 1997.

SILVA, Silvia R. P. da; **Avaliação bacteriológica e parasitológica em hortaliças minimamente processadas comercializadas em Porto Alegre – RS**. 2006. 87f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

SOARES, N. de F. F.; SILVA, W. A. da; PIRES, A. C. dos S.; CAMILLOTO, G. P.; SILVA, P. S. Novos desenvolvimentos e aplicações em embalagens de alimentos. **Revista Ceres**, 56(4): 370-378, 2009.

STROHL, William A.; ROUSE, Harriet; FISHER, Bruce D.; **Microbiologia ilustrada**. Porto Alegre, RS: Artmed, 2004. p. 189 – 195.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. Microbiologia. In: **Doenças microbianas do sistema digestivo**. 8ª ed. Porto Alegre, RS: Artmed Editora SA, 2005. p. 705 - 717.

TRESSELER, J. F. M; FIGUEIREDO, E. A. T. de; FIGUEIREDO, R. W.; MACHADO, T. F.; DELFINO, C. M.; SOUSA, P. H. M. de. Avaliação da qualidade microbiológica de hortaliças minimamente processadas. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 33, Edição Especial, p. 1722 -1727, 2009

VALERIANO, C.; PICCOLI, R. H.; CARDOSO, M. G.; ALVES, E. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais em bactérias patogênicas de origem alimentar. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.14, n.1, p.57-67, 2012

VERMELHO, Alane Beatriz; PEREIRA, Antônio F.; COELHO, Rosalie R. R.; SOUTO-PADRÓN, Thaís Cristina B. S. **Práticas de microbiologia**. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2006.

WELKER, C. A. D.; BOTH, J. M. C.; LONGARAY, S. M.; HAAS, S.; SOEIRO, M. L. T.; RAMOS, R. C. Análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **R. bras. Bioci.**, Porto Alegre, v. 8, n. 1, p. 44-48, jan./mar. 2010.

YAMAGUCHI, M. H.; GARCIA, R. F. Ó Leo de copaíba e suas propriedades medicinais: revisão bibliográfica. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 5, n. 1, p. 137-146, jan./abr. 2012.