

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE AGRONOMIA ELISEU MACIEL
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**



Dissertação:

Atividade antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de araçá (*Psidium cattleianum* S.) e pitanga (*Eugenia uniflora* L.) sobre patógenos de origem alimentar

Marcelle Oliveira Garcia

Bióloga

Pelotas/RS, 2018

Marcelle Oliveira Garcia

Atividade antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de araçá (*Psidium cattleianum* S.) e pitanga (*Eugenia uniflora* L.) sobre patógenos de origem alimentar

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA) da Faculdade de Agronomia, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Wladimir Padilha da Silva

Co-orientadores: Eduarda Hallal Duval

Rita de Cássia dos Santos da Conceição

Pelotas/RS, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

G216a Garcia, Marcelle Oliveira

Atividade antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de araçá (*Psidium cattleianum* S.) e pitanga (*Eugenia uniflora* L.) sobre patógenos de origem alimentar / Marcelle Oliveira Garcia ; Wladimir Padilha da Silva, orientador ; Eduarda Hallal Duval, Rita de Cássia dos Santos da Conceição, coorientadoras. — Pelotas, 2018.

92 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Conservante natural. 2. DTA. 3. Alimentos cárneos. 4. *Staphylococcus aureus*. 5. *Escherichia coli*. I. Silva, Wladimir Padilha da, orient. II. Duval, Eduarda Hallal, coorient. III. Conceição, Rita de Cássia dos Santos da, coorient. IV. Título.

CDD : 664

Marcelle Oliveira Garcia

Atividade antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de araçá (*Psidium cattleianum* S.) e pitanga (*Eugenia uniflora* L.) sobre patógenos de origem alimentar

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA) da Faculdade de Agronomia, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 27/02/2018

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Eduarda Hallal Duval (Co-orientadora)
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Eliezer Avila Gandra
Doutor em Ciências e Tecnologia em Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas

Prof.^a Dr.^a Gladis Aver Ribeiro
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof.^a Dr.^a Patrícia da Silva Nascente
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dedico este trabalho a minha família, por todo o amor, incentivo aos estudos e confiança.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus pela saúde, força, fé e por ter me permitido realizar esse desafio.

A toda minha família, em especial aos meus pais Marijane Oliveira Garcia e Elpidio Machado Garcia pelo constante apoio e motivação demonstrados ao longo desses dois anos.

A minha irmã Karine Oliveira Garcia pelo incentivo e por acreditar sempre no meu potencial.

Ao meu namorado Cristian de Souza Batista por estar ao meu lado durante essa jornada, pelo amor, pela ajuda e pela compreensão, pois houve dias difíceis que sempre foram aliviados com seu carinho e cuidado.

Agradeço ao comitê de orientação, constituído pelos professores Dr. Wladimir Padilha da Silva, Dr.^a Eduarda Hallal Duval e Dr.^a Rita de Cássia dos Santos da Conceição pela oportunidade e ensinamentos.

Ao professor Dr. Eliezer Avila Gandra pela ajuda e atenção.

Ao professor Dr. Rogério Antônio Freitag por disponibilizar o uso do Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais (UFPel), a doutoranda Ivandra Ignês de Santi e a estagiária Letícia Raiele pela ajuda no processo de extração e na GC-MS.

A professora Dr.^a Eliana Badiale Furlong por permitir o uso do Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos (FURG) para a realização dos extratos, caracterização química e determinação dos compostos fenólicos totais e a doutoranda Marcy Helli Rodrigues pela ajuda e apoio.

As estagiárias Gabriele Delgado, Laura Barreto e Gabriela Jardim pela ajuda e disponibilidade sempre que foi necessário.

A todos os colegas, professores, funcionários e estagiários do Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal pelo companheirismo, amizade, esclarecimentos de dúvidas e pela ajuda ao longo destes dois anos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

E a todos que de algum modo, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Obrigada a todos!

Não existem sonhos impossíveis para aqueles que realmente acreditam que o poder realizador reside no interior de cada ser humano, sempre que alguém descobre esse poder algo antes considerado impossível se torna realidade.

(Albert Einstein)

Resumo

Garcia, Marcelle Oliveira. **Atividade antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de araçá (*Psidium cattleianum* S.) e pitanga (*Eugenia uniflora* L.) sobre patógenos de origem alimentar.** 2018. 92f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas. 2018.

As doenças transmitidas por alimentos são um grande problema de saúde pública. Nos últimos anos, estudos têm sido realizados com frutas nativas do Brasil e direcionados à descoberta de novos agentes antimicrobianos, provenientes de plantas, para que possam ser utilizados como antimicrobianos naturais por apresentarem compostos bioativos na sua composição. O objetivo deste estudo foi caracterizar quimicamente, avaliar e comparar a atividade antimicrobiana de óleos essenciais e extratos metanólicos de *Psidium cattleianum* S. (araçá) e *Eugenia uniflora* L. (pitanga) contra cepas padrão e isolados provenientes de alimentos cárneos de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*. Através da cromatografia gasosa acoplada a espectrofotometria realizada para os óleos essenciais foi identificado 21 compostos para *P. cattleianum* S., sendo o beta-cariofileno (20,40%) o principal e 14 constituintes para *E. uniflora* L. com o elixeno (24,47%) como majoritário. Já na caracterização química dos extratos utilizando cromatografia por HPLC-UV encontraram como ácidos fenólicos 2,95mg.g⁻¹ de ácido gálico (*E. uniflora* L.) e 2,08mg.g⁻¹ de ácido cafeico (*P. cattleianum* S.). Na determinação de compostos fenólicos totais, os resultados mostraram 1,72mg.g⁻¹ de fenóis totais para o extrato de *E. uniflora* L. e 7,1mg.g⁻¹ para *P. cattleianum* S.. A análise do perfil de sensibilidade das cepas e isolados mostrou que os isolados e cepa padrão de *Salmonella* apresentaram 100% de sensibilidade a pelo menos 4 antimicrobianos (estreptomicina, gentamicina, norfloxacin e levofloxacin), os isolados e a cepa padrão de *S. aureus* apresentaram 100% de sensibilidade frente a norfloxacin, ciprofloxacina e gentamicina; a cepa padrão e os isolados de *E. coli* foram sensíveis a onze dos dezesseis antimicrobianos avaliados; e a cepa e os isolados de *Listeria* apresentaram 100% de sensibilidade a cloranfenicol, gentamicina, trimetoprima e levofloxacin. Foram realizadas análises microbiológicas: potencial antimicrobiano, concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM), sendo que nos testes o óleo essencial de *E. uniflora* L. foi utilizado em concentrações variando entre 270mg.mL⁻¹ a 1,6mg.mL⁻¹, *P. cattleianum* entre 291,3mg.mL⁻¹ a 1,7mg.mL⁻¹. Já para os extratos, o extrato metanólico de *E. uniflora* L. variando entre 251,7mg.mL⁻¹ a 1,5mg.mL⁻¹ e o de *P. cattleianum* S. entre 244,4mg.mL⁻¹ a 1,4mg.mL⁻¹. Os resultados mostraram que as concentrações de CIM de 107,8mg.mL⁻¹ para o extrato de *E. uniflora* L., de 244,4mg.mL⁻¹ para o extrato de *P. cattleianum* S., 291,3 mg.mL⁻¹ para o óleo essencial de *P. cattleianum* S. e 54 mg.mL⁻¹ para o óleo de *E. uniflora* L. foram as concentrações que garantiram a inibição de todos os micro-organismos testados. O óleo essencial de *E. uniflora* L. foi o mais eficaz para inibir o crescimento de bactérias de importância alimentar, pois apresentou a concentração de 54mg.mL⁻¹ como a menor concentração suficiente para inibir todas as bactérias testadas e 270mg.mL⁻¹ para eliminá-las.

Palavras-chave: conservante natural; DTA; alimentos cárneos; *Staphylococcus aureus*; *Escherichia coli*; *Salmonella* spp.; *Listeria* spp.

Abstract

Garcia, Marcelle Oliveira. **Antimicrobial activity of extracts and essential oils of araçá (*Psidium cattleianum* S.) and pitanga (*Eugenia uniflora* L.) on foodborne pathogens.** 2018. 92f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas. 2018.

Foodborne diseases are a major public health problem. In the last years, studies have been carried out with Brazilian native fruits and directed to the discovery of new antimicrobial agents from plants, so that they can be used as natural antimicrobials because they present bioactive compounds in their composition. The objective of this study was to characterize chemically, evaluate and compare the antimicrobial activity of essential oils and methanolic extracts of *Psidium cattleianum* S. (araçá) and *Eugenia uniflora* L. (pitanga) against standard strains and isolated strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes*. Gas chromatography coupled to spectrophotometry was performed for the essential oils 21 compounds were identified for *P. cattleianum* S., with beta-caryophyllene (20,40%) being the main constituent and 14 constituents for *E. uniflora* L., with elixene (24,47%) as the majority. In the chemical characterization of the extracts using HPLC-UV chromatography, were found as phenolic acids, 2.95 mg.g⁻¹ of gallic acid (*E. uniflora* L.) and 2.08 mg.g⁻¹ of caffeic acid (*P. cattleianum* S.). In the determination of total phenolic compounds, the results showed 1.72mg.g⁻¹ of total phenols for the extract of *E. uniflora* L. and 7.1mg.g⁻¹ for *P. cattleianum* S.. Analysis of the sensitivity profile of strains and isolates showed that the isolates and standard strain of *Salmonella* showed 100% sensitivity to at least 4 antimicrobials (streptomycin, gentamicin, norfloxacin and levofloxacin), the isolates and the standard strain of *S. aureus* presented 100% sensitivity to norfloxacin, ciprofloxacin and gentamicin; the standard strain and *E. coli* isolates were sensitive to eleven of the sixteen antimicrobials evaluated; and the strain and *Listeria* isolates showed 100% sensitivity to chloramphenicol, gentamicin, trimethoprim and levofloxacin. Microbiological analyzes were performed: antimicrobial potential, minimum inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC), and in the tests the essential oil of *E. uniflora* L. was used in concentrations varying between 270mg.mL⁻¹ to 1.6mg.mL⁻¹, *P. cattleianum* S. from 291.3mg.mL⁻¹ to 1.7mg.mL⁻¹. For the extracts, the methanolic extract of *E. uniflora* L. ranging from 251.7mg.mL⁻¹ to 1.5mg.mL⁻¹ and *P. cattleianum* S. from 244.4mg.mL⁻¹ to 1, 4mg.mL⁻¹. The results showed that MIC concentrations of 107.8mg.mL⁻¹ for the extract of *E. uniflora* L., 244.4mg.mL⁻¹ for extract of *P. cattleianum* S., 291.3mg.mL⁻¹ for *P. cattleianum* S. essential oil and 54mg.mL⁻¹ for *E. uniflora* L. oil were the concentrations that ensured the inhibition of all tested microorganisms. The essential oil of *E. uniflora* L. was the most effective to inhibit the growth of food-grade bacteria, as it presented the concentration of 54mg.mL⁻¹ as the lowest concentration sufficient to inhibit all the bacteria tested and 270mg.mL⁻¹ to eliminate them.

Keywords: natural preservative; DTA; meat products; *Staphylococcus aureus*; *Escherichia coli*; *Salmonella* spp.; *Listeria* spp.

Lista de Figuras

Figura 1	<i>Psidium cattleianum</i> S. (Araçá Amarelo)	24
Figura 2	<i>Eugenia uniflora</i> L. (Pitanga Vermelha)	25
Figura 3	Principais rotas de biossíntese de metabólitos secundários e suas inter-relações com o metabolismo primário.....	27
Figura 4	Estrutura química dos ácidos hidroxibenzoicos (a) e hidroxicinâmicos (b)	28
Figura 5	Esquema simplificado da rota de produção dos terpenos, a partir do ácido mevalônico e exemplificação dos grupos de estruturas moleculares possíveis	29
Figura 1	Cromatograma representativo dos picos relativos aos compostos dos óleos essenciais de folhas das plantas (A) <i>E. uniflora</i> L. e (B) <i>P. cattleianum</i> S. por GC-MS. Os compostos encontrados em cada uma das plantas estão representados pelos devidos picos (A) <i>E. uniflora</i> L. = 1: beta-elemeno, 2: beta-cariofileno, 3: alloaromadendrene, 4: germacreno D, 5: gama-elemeno, 6: eremofileno, 7: beta-cadineno, 8: elixeno, 9: spathulenol, 10: ledol, 11: aromandendrene, 12: não identificado, 13: etenil – 4,5,6,7 – tetra-hidro, 14: germacreno. (B) <i>P. cattleianum</i> S. = 1: alfa-pineno, 2: beta-mirceno, 3: p-cineole, 4: beta-linalol, 5: alfa-cubebeno, 6: beta-cariofileno, 7: alfa-cariofileno, 8: germacreno D, 9: beta-selineno, 10: alfa-selineno, 11: alfa-muuroleno, 12: alfa-himachaleno, 13: gama-muuroleno, 14: delta-cadineno, 15: valenceno, 16: Selina – 3,7 (11)-dieno, 17:trans-nerolidol, 18: óxido de cariofileno, 19: palustrol, 20: delta-cadinol, 21: selina-6-em-4-ol.....	54

Lista de Tabelas

Tabela 1	Parâmetros de calibração para a determinação de ácidos fenólicos por HPLC-UV em extratos de <i>P. cattleianum</i> S. e <i>Eugenia uniflora</i> L.	35
Tabela 1	Parâmetros de calibração para a determinação de ácidos fenólicos por HPLC-UV em extratos de <i>P. cattleianum</i> S. e <i>Eugenia uniflora</i> L.	49
Tabela 2	Compostos químicos encontrados nos óleos essenciais das folhas de plantas de <i>Eugenia uniflora</i> L. e <i>P. cattleianum</i> S. realizados por cromatografia gasosa acoplada a espectrofotometria de massa (GC-MS).....	55
Tabela 3	Atividade antimicrobiana dos extratos e óleos essenciais de <i>P. cattleianum</i> S. e de <i>E. uniflora</i> L. por potencial antimicrobiano (PA), concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) frente a micro-organismos patogênicos de origem alimentar.	60

Lista de abreviaturas e siglas

AA	Araçá Amarelo
ANOVA	Análise de Variância
ATCC	American Type Culture Collection
AV	Araçá Vermelho
BHI	Brain Heart Infusion (ágar ou caldo)
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CG	Cromatografia Gasosa
CTT	Cloreto 2,3,5 – Trifeniltetrazólio
DO	Densidade Óptica
DTA	Doença Transmitida por Alimento
EA	Extrato de Araçá
EAq	Extrato Aquoso
EE	Extrato Etanólico
EP	Extrato de Pitanga
eV	Elétron-Volt
FURG	Universidade Federal de Rio Grande
g	Gramas
h	Horas
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IAL	Instituto Adolfo Lutz
Kg	Quilogramas
Km	Quilômetros
LAMCA	Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos
LIPOA	Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal
LOD	Limite de Detecção
LOQ	Limite de Quantificação
LPPN	Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais
m	Metros
min	Minutos
mg	Miligramas

mL	Mililitro
mm	Milímetro
mol.L ⁻¹	Molar
MH	Muller-Hinton (ágar)
MS	Espectrometria de Massa
NCTC	National Collection of Type Cultures
nm	Nanômetro
ND	Não Determinado
NI	Não Identificado
OE	Óleo Essencial
OA	Óleo Essencial de Araçá
OP	Óleo Essencial de Pitanga
PA	Potencial antimicrobiano
r ²	Coeficiente de Determinação
rpm	Rotações por minuto
RSD	Desvio Padrão Relativo
S	Sul
TR	Tempo de Retenção
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFPeI	Universidade Federal de Pelotas
UV	Radiação Ultravioleta
var	Variedade
v/v	Relação volume/ volume
W	Oeste
°C	Graus Celsius
μL	Microlitros
μg	Microgramas
%	Percentual

Sumário

1. Introdução	16
2. Objetivos	18
2.1. Objetivo geral	18
2.2. Objetivos específicos	18
3. Revisão de Literatura	19
3.1. Atividade antimicrobiana das plantas	19
3.2. Bactérias patogênicas	20
3.2.1. <i>Salmonella</i> spp.	20
3.2.2. <i>Escherichia coli</i> O157:H7	20
3.2.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	21
3.2.4. <i>Listeria</i> spp.	22
3.3. Família Myrtaceae	22
3.3.1. <i>Psidium cattleianum</i> S. (Araçá)	23
3.3.2. <i>Eugenia uniflora</i> L. (Pitanga)	24
3.4. Metabolismo Secundário das plantas	26
3.4.1. Compostos fenólicos	27
3.4.2. Terpenos	28
4. Relatório do Trabalho de Campo	30
4.1. Materiais e Métodos	30
4.1.1. Material Vegetal	30
4.1.1.1. Coleta e identificação	30
4.1.1.2. Micro-organismos avaliados	30
4.1.1.3. Obtenção dos extratos vegetais	31
4.1.1.4. Obtenção dos óleos essenciais	32
4.2. Caracterização química dos extratos metanólicos	32
4.3. Caracterização química dos óleos essenciais	33
4.4. Determinação dos compostos fenólicos totais dos extratos vegetais	33
4.5. Parâmetros analíticos	34
5. Análises Microbiológicas	36
5.1. Condições de cultivo dos micro-organismos	36

5.2. Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos	36
5.3. Potencial antimicrobiano	37
5.3.1. Óleos essenciais	37
5.3.2. Extratos vegetais	37
5.4. Determinação da concentração inibitória mínima	38
5.5. Determinação da concentração bactericida mínima	39
6. Análise estatística	40
7. Manuscrito 1 – Atividade antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de <i>Psidium cattleianum</i> S. e <i>Eugenia uniflora</i> L. sobre patógenos de origem alimentar	41
8. Considerações finais	79
9. Referências	80

1. Introdução

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) são uma importante causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo, constituindo um problema de saúde pública e afetando o desenvolvimento econômico dos países (WHO, 2015). As doenças transmitidas por alimentos são geralmente de natureza infecciosa ou tóxica e causadas por bactérias, vírus, parasitas ou substâncias químicas que entram no corpo através de alimentos contaminados ou água. As bactérias, pela sua diversidade e patogenia, constituem o grupo microbiano mais importante associado às DTA. Os alimentos que não são preparados de forma higiênica ou não tem conservação e armazenamento adequados, podem ser os principais responsáveis pelo desenvolvimento de micro-organismos e suas toxinas. Os patógenos alimentares mais comuns envolvidos em casos de DTA e que afetam milhões de pessoas por ano, às vezes com resultados graves e fatais, são *Escherichia coli* enterohemorrágica, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp., *Listeria* sp., *Campylobacter* sp., *Vibrio cholerae*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus*, dentre outros, sendo os alimentos mais envolvidos nestes casos os provenientes de animais, produtos derivados e alimentos altamente manipulados (RIBEIRO, 2011; WHO, 2017).

O controle das contaminações e alterações indesejáveis que ocorrem em alimentos, tradicionalmente envolve a aplicação de conservantes químicos, utilizados com frequência pelas indústrias para garantir a segurança microbiológica dos seus produtos (CALO et al., 2015; MACWAN et al., 2016). Contudo, seu uso tem sido reconhecido por causar alguns perigos à saúde humana, pois muitos destes agentes antimicrobianos químicos estão envolvidos em uma série de sintomas agudos (alergias) (ALVES; ABRANTES, 2003), incluindo alergias respiratórias (GUTIERREZ; BARRY-RYAN; BOURKE, 2009), carcinogenicidade, principalmente no trato gastrointestinal e colo-retal (RESENDE et al., 2006; GARÓFOLO, 2004),

teratogenicidade e toxicidade, além de déficit de atenção e hiperatividade (POLÔNIO; PERES, 2009). Como consequência, os consumidores procuram substituir os conservantes artificiais por conservantes naturais, com a intenção de buscar alimentos livres desses agentes químicos (FALEIRO, 2011).

Há muitos anos produtos derivados de plantas vêm despertando grande interesse nas pesquisas, por serem potencialmente úteis no controle e diminuição de micro-organismos que causam prejuízos nas indústrias de alimentos (SOUZA et al. 2011).

As plantas da família Myrtaceae têm apresentado expressiva atividade antimicrobiana frente a diferentes micro-organismos (VICTORIA et al., 2012; BONA et al, 2014; SOLIMAN et al., 2016).

Diversos estudos vêm sendo desenvolvidos com a intenção da descoberta de novos agentes antimicrobianos provenientes de plantas para que possam ser utilizados em produtos farmacêuticos, cosméticos e na indústria alimentícia, com o objetivo de descobrir compostos com atividade antimicrobiana comparada à dos tradicionalmente utilizados, porém, com menor toxicidade, mais eficazes contra a resistência de micro-organismos patogênicos e com menor impacto ambiental (VICTORIA et al., 2012; BONA et al., 2014; SCUR et al. 2016; DANNENBERG et al., 2016; SANTI et al., 2017).

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Caracterizar quimicamente, avaliar e comparar a atividade antimicrobiana de óleos essenciais e extratos metanólicos de *Psidium cattleianum* S. (araçá) e de *Eugenia uniflora* L. (pitanga) contra cepas padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 12900, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e contra isolados de *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella* spp. e *Listeria* spp. provenientes de alimentos cárneos, obtidos na indústria e em estabelecimentos comerciais.

2.2. Objetivos Específicos

- Obter os óleos essenciais e extratos metanólicos de frutos de *P. cattleianum* S. e *E. uniflora* L.;
- Caracterizar quimicamente os óleos essenciais e extratos de *P. cattleianum* S. e *E. uniflora* L.;
- Avaliar a ação dos extratos metanólicos e do óleo essencial de *P. cattleianum* S. frente aos patógenos utilizados no trabalho;
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos óleos essenciais e extratos contra os diferentes patógenos testados;
- Avaliar a concentração bactericida mínima dos óleos essenciais e extratos (CBM);
- Comparar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais e extratos de *P. cattleianum* S. e *E. uniflora* L..

3. Revisão de Literatura

3.1. Atividade antimicrobiana das plantas

Bactérias patogênicas são um grande problema tanto para a indústria de alimentos quanto para o setor de saúde pública (TAUXE et al., 2010), podendo causar infecções transmitidas por alimentos ou intoxicações, que são comuns e frequentes entre a população mundial (CDC, 2017).

Os conservantes sintéticos tradicionalmente empregados para o controle microbiano, na indústria de alimentos, vêm encontrando crescente rejeição por parte dos consumidores, que tem buscado alimentos mais próximos ao natural (CALO et al., 2015). Os aditivos sintéticos têm causado problemas para a saúde, e devido a isto, fontes alternativas de conservantes naturais precisam ser exploradas (NEGI, 2012).

Produtos naturais, derivados de plantas, apresentam atividade antimicrobiana devido à presença de substâncias que são principalmente metabólitos oriundos do metabolismo secundário das plantas, que atuam no mecanismo de ação inibindo ou eliminando bactérias patogênicas. Esses metabólitos têm uma ampla gama de atividades, de acordo com a espécie da planta (SAVOIA et al., 2012).

A composição e concentração dos componentes dos óleos essenciais e extratos vegetais são bastante variáveis, sendo influenciadas por diversos fatores como: espécie vegetal, partes da planta, clima, altitude, tempo de coleta e fase de crescimento. Alguns fatores fazem o óleo ou extrato proveniente de uma mesma espécie, ou até mesmo de um mesmo exemplar, mas em estações e/ou safras diferentes apresentarem diferenças quantitativas e qualitativas na sua composição (BAKKALI et al, 2008; SANTOS; NOVALES, 2012; KAVOOSI et al., 2013), sendo assim, variações na estrutura e composição química desses compostos resultam em diferenças na sua ação antimicrobiana (SAVOIA et al., 2012).

Estudos recentes têm avaliado a utilização de antimicrobianos como bioconservantes naturais para alimentos, seja aplicando diretamente na matriz alimentícia (DANNENBERG et al., 2016) ou, indiretamente utilizando em embalagens (DANNENBERG et al., 2017), sendo que ambos modelos têm demonstrado bom potencial para aplicação tecnológica. Santurio (2015) observou ao testar óleos essenciais para o controle de bactérias patogênicas em alimentos, que o uso dos mesmos adicionados em produtos cárneos podem aumentar a vida útil e diminuir a contaminação de patógenos.

3.2. Bactérias patogênicas

3.2.1. *Salmonella* spp.

O gênero *Salmonella* pertence a família *Enterobacteriaceae* e são descritos como bacilos Gram-negativos não formadores de esporos, de superfície lisa, catalase-positiva e oxidase-negativa (VARNAM, 1991).

Este gênero compreende duas espécies, *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica*, com mais de 2.500 sorovares (GRIMONT; WEILL, 2007), sendo que *Salmonella enterica* possui 6 subespécies (ISSENHUTH-JEANJEAN et al., 2014). Embora todos os sorovares sejam potencialmente patogênicos, apenas alguns sorovares de *S. enterica* subsp. *enterica* são de importância em saúde pública (KTSOYAN et al., 2013).

3.2.2. *Escherichia coli* O157:H7

Escherichia coli é um micro-organismo gram-negativo, comensal do trato gastrointestinal do homem e animais. Contudo, alguns grupos de cepas de *E. coli* são patogênicas. *Escherichia coli* patogênicas são comumente classificadas em 6 patotipos: *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* de aderência difusa (DAEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) (FORSYTHE, 2013).

Escherichia coli O157:H7 é uma EHEC e um dos mais importantes patógenos transmitidos por alimentos, devido a produção da toxina de Shiga (STEC) que pode causar doenças severas, como a colite hemorrágica, que pode evoluir para síndrome hemolítica urêmica (BUCHANAN, 1997; AMANI et al., 2015).

3.2.3. *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* são cocos Gram e catalase-positivos, com aproximadamente 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, imóveis, não-esporulados e geralmente não-encapsulados. Essa bactéria pode apresentar-se em diversas formas, que vão desde isolados, aos pares, em cadeias curtas, ou agrupados irregularmente (com aspecto semelhante a um cacho de uvas), devido à sua divisão celular, que ocorre em três planos perpendiculares (TRABULSI; ALTHERTHUM, 2005). *S. aureus* coloniza principalmente as vias aéreas superiores e a pele, sendo encontrado em 20-40% da população. A patogênese de *S. aureus* se inicia com a colonização do indivíduo, consequência da adesão bacteriana aos tecidos ou dispositivos protéicos, através de suas variadas proteínas de superfície. Após a fixação, utilizam meios para escapar do sistema imune, como por exemplo, formação de biofilmes, dificultando a atuação de células do sistema de defesa e ação de antimicrobianos (CORREAL et al., 2013). Além disso, *S. aureus* é um dos principais agentes bacterianos causadores de doenças de origem alimentar em todo o mundo (EFSA, 2010; LE-LOIR et al., 2003) e é o principal componente da microbiota humana, na qual um elevado grau de manipulação pode aumentar a disseminação de *S. aureus* para alimentos e superfícies de contato. Em condições adequadas, o micro-organismo multiplica-se no alimento, atingindo concentrações elevadas ($\geq 10^5$ micro-organismos/g), favoráveis à produção de enterotoxinas de quatro a seis horas mais tarde. As enterotoxinas estafilocócicas (SES) são resistentes a proteases, mantendo, assim, a sua atividade no trato digestivo após a ingestão (FRANCO; LANDGRAF, 2008), ocasionando um grande problema à saúde.

3.2.4. *Listeria* spp.

O gênero *Listeria* é composto por bactérias Gram-positivas sendo elas bastonetes curtos, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, medindo de 0,4 – 0,5 µm de diâmetro e 0,5 – 2,0 µm de comprimento. Crescem a temperaturas que variam de -4 °C à 45 °C, tolerando ampla faixa de pH (4,4 – 9,4), além de sobreviverem a elevadas concentrações de NaCl (10%) (ALEJANDRA et al., 2013; FORSYTHE, 2013).

Apenas a espécie *L. monocytogenes* é considerada patogênica ao humano e a principal via de transmissão desse patógeno é através do consumo de alimentos contaminados (ALLERBERGER; WAGNER, 2010).

3.3. Família Myrtaceae

A família Myrtaceae é constituída de diversos frutos, dentre eles: araçá (*P. cattleianum* S.), pitanga (*Eugenia uniflora* L.), jabuticaba (*Plinia* spp.), goiaba (*P. guajava* L.), jambolão (*Syzygium cumini* L.), guabiroba (*Campomanesia fenzliana* B.), cambucá (*Marlierea edulis* N.), camu-camu (*Myrciaria dúbia*), uvaia (*E. pyriformis* C.) e cravo (*Syzygium aromaticum*). Esta família caracteriza-se por possuir espécies que produzem pequenos frutos (LORENZI et al., 2006; SANTOS, 2006).

Atualmente diversas pesquisas têm mostrado que muitas plantas apresentam atividade antimicrobiana (MEDINA et al., 2011; DESOTI et al., 2011; VICTORIA et al., 2014; FERNANDES, et al., 2014; SCUR et al., 2016). Medina et al. (2011) quando avaliaram frutas nativas do Brasil, como araçá (*Psidium cattleianum* S.), notaram que o extrato de araçá, tanto amarelo como vermelho, inibiu o crescimento de *S. Enteritidis* ATCC 13076 com 5% de concentração inibitória mínima (CIM).

Em outro estudo, o extrato de *P. cattleianum* produzido com acetato de etila apresentou CIM de 125ug.mL⁻¹ contra *S.aureus*, enquanto o extrato metanólico mostrou uma CIM de 250ug.mL⁻¹, mas ambos extratos não tiveram efeito contra micro-organismos gram-negativos (*E. coli* ATCC 8739 e *S. Typhi* IAL 1434) (DESOTI et al., 2011). Já Fernandes et al. (2014), testaram o potencial antimicrobiano da goiaba (*Psidium guajava* L.) frente a *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, percebendo

efeito inibitório com uma CIM de 100, 250 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Victoria et al. (2012) encontraram CIM de 0,8 mg.mL^{-1} para *S. aureus* e de 1,04 mg.mL^{-1} para *L. monocytogenes* quando testaram óleo essencial de pitanga (*E. uniflora* L).

Segundo Scur et. al. (2016) extratos de araçá (*P. cattleianum* S.) apresentaram ação antimicrobiana contra patógenos de importância para a saúde pública, incluindo *S. Enteritidis*, *E. coli* e *S. aureus*, com CIM de 25, 6,25 e 3,125 mg.mL^{-1} , respectivamente, para o extrato etanólico e de 50, 12,5 e 12,5 mg.mL^{-1} para o extrato aquoso. Já o óleo essencial de araçá apresentou CIM de 200 mg.mL^{-1} para as três cepas testadas. Segundo os autores, os componentes majoritários no óleo essencial de *P. cattleianum* S. foram alfa-copaene, eucalyptol, delta-cadineno e alfa-selineno, nesta ordem, enquanto testes fitoquímicos realizados com extratos vegetais aquosos e etanólicos de *P. cattleianum* S. revelaram a presença de flavonoides, terpenoides e taninos, podendo ser estes os responsáveis pela ação antimicrobiana.

3.3.1. *Psidium cattleianum* S. (Araçá)

O gênero *Psidium* é representado por aproximadamente 120 a 150 espécies. O araçazeiro (*P. cattleianum* Sabine), também conhecido pelos nomes de araçá (Figura 1), araçá-do-mato, araçá-do-campo e araçá-amarelo (RASEIRA, 2004), apresenta-se como uma das espécies com importância econômica da família das mirtáceas, ocorrendo em extensa área na costa atlântica brasileira, desde a Bahia até o Rio Grande do Sul, estendendo-se também ao nordeste do Uruguai. No Rio Grande do Sul, é comum na planície costeira, na Floresta Atlântica e, eventualmente, na Depressão Central (FRANZON, 2004; SANTOS et al., 2008; LISBOA; KINUPP; BARROS, 2011).

A região Sul do Brasil é umas das três áreas do mundo a apresentar maior diversidade de plantas desse gênero, o que fomenta a realização de pesquisas para estimular economicamente e socialmente essa região (VANIN, 2015).

O araçazeiro é uma árvoreta ou arbusto, apresentando de 1-9 metros de altura, com tronco tortuoso, casca fina e castanho-avermelhada. As flores são

axilares, solitárias e brancas e as folhas são coriáceas, brilhantes e aromáticas. Os frutos são bagas globosas, piriformes, ovoides ou achatadas, de coloração amarela ou vermelha quando maduros, coroadas pelas sépalas persistentes e com numerosas sementes. A maturação ocorre de janeiro a março e sua principal forma de propagação é por sementes (LORENZI et al., 2006; CORADIN; SIMINSKI; REIS, 2011).

Essas espécies são ricas em compostos fenólicos, ácido ascórbico e carotenos, geralmente relacionadas com propriedades biológicas importantes, tais como, o aumento da proteção contra oxidação celular, atividade antimicrobiana e anti-carcinogênica (PROTEGGENTE et al., 2002; SUN et al., 2002).



Figura 1. *Psidium cattleianum* S. (Araçá amarelo)
Fonte: A autora

3.3.2. *Eugenia uniflora* L. (Pitanga)

A *Eugenia uniflora* L. pertence à família Myrtaceae, e é um fruto nativo do Brasil, conhecida popularmente como pitanga (Figura 2). Encontra-se disseminada, praticamente por todo o território nacional e em diversas partes do mundo, em função da adaptação às diferentes condições de solo e clima (LIRA JÚNIOR et al., 2007). O fruto e as folhas são fontes de compostos potencialmente bioativos como compostos fenólicos e carotenóides (LIMA; MÉLO; LIMA, 2002; MASSARIOLI et al., 2013), que apresentam potenciais efeitos benéficos à saúde humana.

A pitangueira caracteriza-se como uma árvore que atinge entre 4 a 5m de altura, podendo chegar a 12m. As folhas são classificadas como opostas, simples,

com pecíolo medindo aproximadamente 2 mm. O fruto da pitanga é classificado como uma baga globosa, achatado nos polos, com 7 a 10 sulcos no sentido longitudinal e coroadado com sépalas persistentes. O fruto maduro pode apresentar coloração laranja, vermelha ou roxa. O sabor da polpa é doce-ácido, possuindo aroma intenso e característico. Na maioria das vezes, há o desenvolvimento de apenas uma semente no fruto, porém pode haver a formação de duas ou três sementes, proporcionalmente menores, globosas e achatadas. Apresentam quantidades expressivas de antocianinas, flavonoides, carotenoides e vitamina C. Os frutos são ricos em cálcio e fósforo e possuem compostos presentes como taninos, flavonoides, alcaloides e saponinas, como também sesquiterpenos e compostos fenólicos (AURICCHIO; BACCHI, 2003; LORENZI et al., 2006; LIRA et al., 2007; BEZERRA et al., 2012). Esses compostos químicos presentes no fruto e nas folhas da pitanga são resultantes do seu metabolismo secundário, possuindo função antimicrobiana. Estudos relatam o potencial antimicrobiano dos extratos e óleo essencial do fruto e de folhas, devido à presença desses compostos (AURICCHIO; BACCHI, 2003; DUARTE, 2006; BRUN; MOSSI, 2010).



Figura 2. *Eugenia uniflora* L. (Pitanga vermelha)
Fonte: A autora

Por isso há a busca cada vez maior de alternativas mais ecoeficientes com a intenção de descobrir novos produtos bioativos, oriundos do metabolismo secundário das plantas, com ação antimicrobiana e com baixo potencial toxicológico para a saúde humana e o meio ambiente (FARIAS; FÁVARO, 2011; SAVOIA et al., 2012; FALEIRO et al., 2016), para que seja utilizado como método de conservação de alimentos.

3.4. Metabolismo Secundário das plantas

Metabolismo consiste em um conjunto de reações metabólicas que ocorrem no interior das células. Em células vegetais pode ser classificado em metabolismo primário e secundário. O metabolismo primário é caracterizado por um conjunto de processos metabólicos que desempenham funções essenciais para os vegetais, como fotossíntese, respiração e transporte de solutos. O metabolismo secundário origina compostos que nem sempre são necessários para que a planta complete seu ciclo de vida; no entanto, desempenham papel importante na interação da planta com o meio ambiente, sendo restritos a uma espécie vegetal ou a um grupo de espécies relacionadas (BOURGAUD et al., 2001; TAIZ; ZEIGER, 2006).

Os metabólitos secundários possuem importante ação frente a fatores bióticos, como herbivoria, ataque de patógenos, competição entre plantas e organismos benéficos (VERPOORTE; MEMELINK, 2002; TAIZ; ZEIGER, 2006; EMERY; SANTOS; BIANCHI, 2011).

O metabolismo secundário das plantas produz moléculas biologicamente ativas, mas que são diretamente afetadas por alterações no metabolismo primário (Figura 3). Estas moléculas são agrupadas em três classes quimicamente distintas: Terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados.

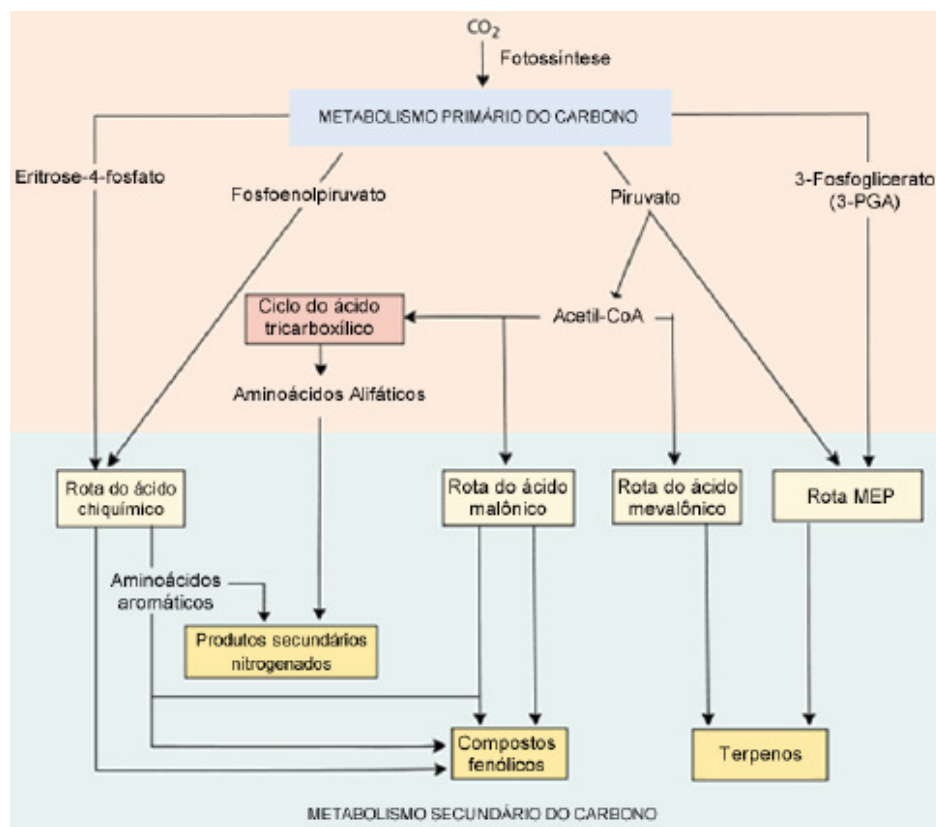


Figura 3. Principais rotas de biossíntese de metabólitos secundários e suas inter-relações com o metabolismo primário.
 Fonte: TAIZ e ZEIGER (2006)

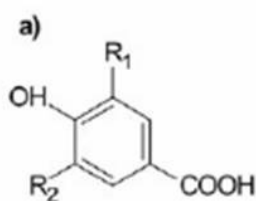
Mesmo sendo classificados em grupos diferentes, os metabolismos primários e secundários não são independentes (Figura 3), e alterações no sistema primário afetam profundamente as reações bioquímicas de síntese dos metabólitos secundários, justificando a sua relação com situações de estresse e função de defesa, fazendo assim com que a divisão desses dois tipos de metabolismos não seja perfeitamente nítida (FALKEMBERG, 2007).

3.4.1. Compostos fenólicos

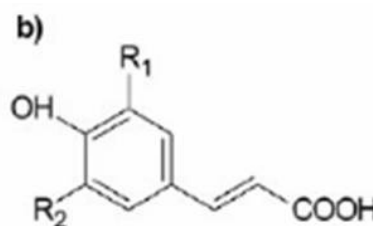
Em alimentos, os compostos fenólicos são responsáveis pela cor, adstringência, aroma e estabilidade oxidativa. Esta classe engloba compostos que apresentam desde moléculas simples, até moléculas com alto grau de polimerização, podendo estar presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a proteínas e açúcares (ANGELO; JORGE, 2007).

Quimicamente são constituídos de pelo menos um anel aromático, no qual ao menos um dos hidrogênios é substituído por um grupamento hidroxila. Estes compostos podem ser classificados em flavonoides (antocianinas, flavonóis e seus derivados) e não flavonoides (ácidos fenólicos e seus derivados e estilbenos) (KING; YOUNG, 1999; SIRIWOHARN et al., 2004; ANGELO; JORGE, 2007).

Dentre os não flavonoides encontram-se os ácidos fenólicos e os estilbenos. Os ácidos fenólicos são caracterizados por apresentarem um anel aromático, um ou mais grupamento hidroxila e/ou metoxila e um grupamento carboxílico. Estes são classificados em dois grupos: os derivados do ácido hidroxibenzoico (ácidos gálico, p-hidroxibenzoico, protocatecoico, vanílico e siríngico), que apresentam sua estrutura disposta na configuração C6-C1 (Figura 4a); e os derivados do ácido hidroxicinâmico (ácidos cafeico, ferúlico e p-cumárico), estando dispostos estruturalmente na configuração C6-C3 (Figura 4b) (TAIZ; ZEIGER, 2006; CHITARRA; CHITARRA, 2005; ANGELO; JORGE, 2007).



Ácido gálico: $R_1 = R_2 = OH$
 Ácido p-hidroxibenzoico: : $R_1 = R_2 = H$
 Ácido protocatecoico: $R_1 = OH, R_2 = H$
 Ácido vanílico: : $R_1 = OCH_3, R_2 = H$
 Ácido siríngico: $R_1 = R_2 = OCH_3$



Ácido p-cumárico: $R_1 = R_2 = H$
 Ácido cafeico: $R_1 = OH, R_2 = H$
 Ácido ferúlico: : $R_1 = OCH_3, R_2 = H$

Figura 4 - Estrutura química dos ácidos hidroxibenzoicos (a) e hidroxicinâmicos (b).
 Fonte: FILHO; PEREIRA; BAYMA, 2005; ANGELO; JORGE, 2007.

3.4.2. Terpenos

Os terpenos ou terpenoides constituem o maior grupo de produtos secundários. As diversas substâncias desta classe são, em geral insolúveis em água e sintetizados através da rota do ácido mevalônico.

Deste precursor é formado o isopreno, molécula com 5 átomos de carbono (C5) que por sua vez representa a unidade básica (monômero) dos terpenos. A partir de ligações do tipo cauda-cabeça unidades de isopreno se unem formando as diferentes estruturas de terpenos. Dentre eles, os principais presentes nos óleos essenciais são os monoterpenos, formados pela ligação de duas moléculas de isopreno (C10) e os sesquiterpenos gerados pela ligação de três moléculas de isopreno (C15). Os monoterpenos podem ser acíclicos, cíclicos ou bicíclicos, enquanto os sesquiterpenos podem ser cíclicos ou ramificados. Além disso, podem estar presentes nessas estruturas grupos orgânicos como alcoóis, aldeídos, cetonas, ácidos, fenóis, éteres e ésteres, que conferem funções biológicas distintas às moléculas (TAIZ; ZEIGER, 2006; BAKKALI et al., 2008; DANNENBERG, 2017). A figura 5 apresenta o processo de formação simplificado dos terpenos bem como as principais diferenças estruturais que podem ser encontradas.

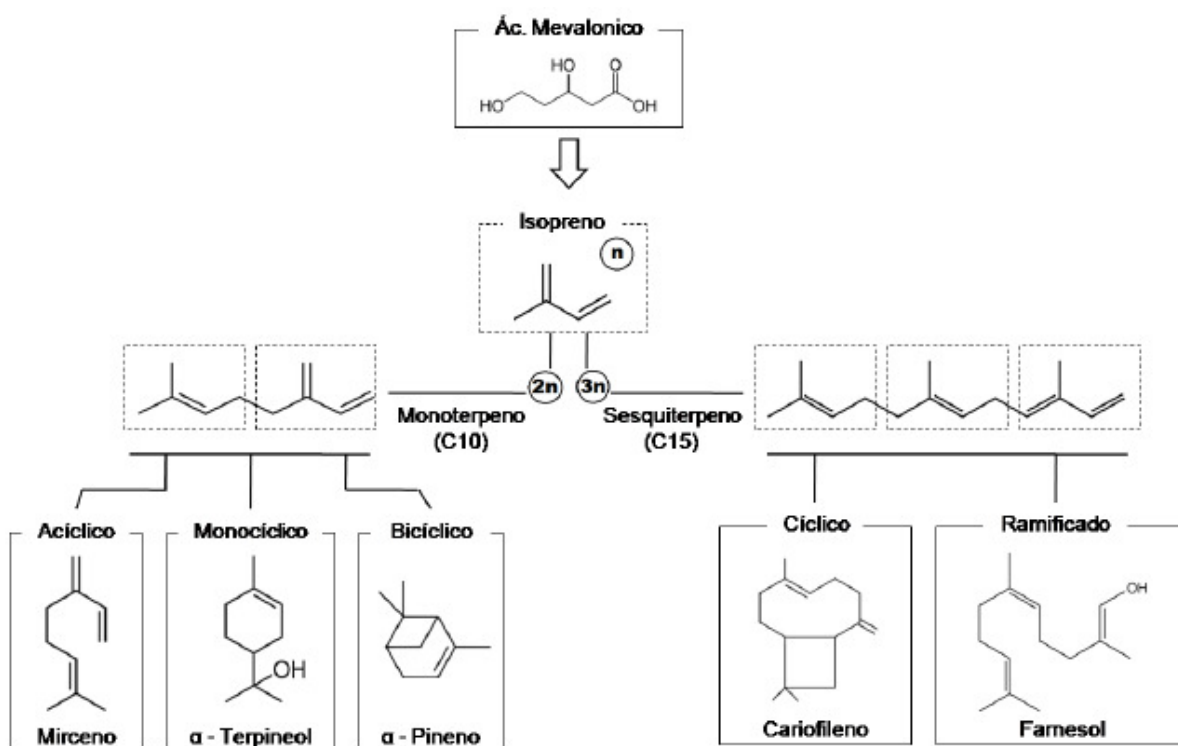


Figura 5 - Esquema simplificado da rota de produção dos terpenos, a partir do ácido mevalônico e exemplificação dos grupos de estruturas moleculares possíveis.
 Fonte: DANNENBERG, 2017

4. Relatório do Trabalho de Campo

4.1. Materiais e Métodos

4.1.1. Material Vegetal

4.1.1.1. Coleta e identificação

As folhas e frutos de plantas adultas e em estágio maduro de *E. uniflora* L. e *P. cattleianum* S. foram obtidas no pomar do Centro Agropecuário da Palma na BR 116 – Km537, no município de Capão do Leão – RS, Brasil, localizada na latitude 31°48'13"S e longitude 52°30'30"W. As coletas do material vegetal foram realizadas, manualmente, em pomar com 100 plantas de *Eugenia uniflora* L. e 50 de *P. cattleianum* S., de forma aleatória, sendo os frutos colhidos durante o mês de fevereiro de 2017 e as folhas em novembro de 2017.

As amostras foram identificadas e o material vegetal armazenado no Herbário PEL lotado no Instituto de Biologia, Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, Rio Grande do Sul, e identificados pelos seguintes números de exsicata: *Psidium cattleianum* S. (PEL N° 26970) e *Eugenia uniflora* L. (PEL N° 26971).

4.1.1.2. Micro-organismos avaliados

Foram utilizadas quatro cepas padrões, sendo elas *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 12900 e *Listeria monocytogenes* ATCC 7644. Além das cepas de referência citadas, três isolados de *Salmonella* spp. provenientes de beef jerky (S1, S2 e S3), três de *Escherichia coli* isoladas de frango a granel (EC 4, EC5 e EC6), três de *Staphylococcus aureus* isolados de peixe salgado (SA7, SA8 e SA9) e cinco de *Listeria* spp. isoladas de carne bubalina (L10, L11, L12, L13 e L14) também foram utilizados no experimento. Todos

os micro-organismos utilizados, já haviam sido confirmados fenotípica e genotipicamente, sendo pertencentes a bacterioteca do Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA), na Faculdade de Veterinária, Departamento de Veterinária Preventiva (UFPel).

4.1.1.3. Obtenção dos extratos vegetais

Os frutos de ambas plantas após serem coletados, foram encaminhados ao laboratório, onde foram higienizados e logo foram congelados em ultrafreezer vertical marca Indrel 335 D, a temperatura de -70°C . Em seguida, foram liofilizados em liofilizador Liotop modelo L101.

Concluída a liofilização dos frutos, os extratos foram obtidos a partir da maceração. Os frutos liofilizados foram macerados manualmente, utilizando gral e pistilo. A extração foi realizada no Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos (LAMCA) - Escola de Química e Alimentos (EQA), Universidade Federal de Rio Grande (FURG), Rio Grande – RS, Brasil. O procedimento de ambos extratos foi realizado em triplicata e foi adaptado ao método descrito por Scaglioni et al. (2014), variando a quantidade de amostra a extrair. A extração foi feita em duas fases, sendo que na fase A foi pesado 5g da amostra de cada um dos frutos macerados e logo foi adicionado 40mL de metanol. Essa mistura foi agitada em incubadora com agitação Tecnal modelo TE- 420 a 138rpm por 2h e após ficou em repouso por 15min a temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 10mL de metanol ao frasco e agitado nas mesmas condições por mais 1h. Na fase B, os extratos obtidos na fase A foram filtrados através de papel filtro para um balão com capacidade de 500mL e logo foram rotaevaporados em evaporador rotativo Quimis modelo Q344B a 60°C . Após o solvente ser totalmente evaporado, foi adicionado 10mL de água destilada, sendo então agitados em banho ultrassônico Unique modelo USC - 1850 por 10min. Em seguida, foi adicionado 5mL de hidróxido de bário $0,1\text{mol.L}^{-1}$ e 5mL de sulfato de zinco 5%, sendo agitados manualmente e depois repousados por 20min. Posteriormente, foi centrifugado em centrífuga Cientec modelo ct 5000r a 500rpm por 15min, sendo retiradas as fases intermediárias, filtradas, colocadas em frasco âmbar e logo armazenadas sob refrigeração a -20°C até serem utilizadas.

4.1.1.4. Obtenção dos óleos essenciais

As folhas de ambas plantas após serem coletadas foram encaminhadas ao Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (LPPN) no Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos (CCQFA-UFPel) e submetidas à secagem em estufa com circulação e renovação de ar Marconi modelo MA 035, a uma temperatura de 37 °C até estarem completamente secas.

Concluída a secagem das folhas, os óleos essenciais foram obtidos a partir de materiais moídos em moinho de facas Lucadema modelo 226 - 1. Em balão, foi adicionado 100g de folhas secas moídas, juntamente com 1000mL de água destilada para que os óleos essenciais fossem extraídos de acordo com a Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010), utilizando o processo de hidrodestilação por arraste a vapor, com o auxílio do equipamento Clevenger durante 4h. Após a extração, os óleos essenciais foram armazenados em frasco âmbar e mantidos a temperatura de -20 °C.

4.2. Caracterização química dos extratos metanólicos

A identificação dos ácidos fenólicos nos extratos foi realizada no LAMCA/EQA-FURG, usando padrões de referência obtidos da Sigma - Aldrich, tais como: gálico (*gallic acid sigma*), protocatecoico (3 - 4 - *dihydroxybenzoico*), clorogênico (*chlorogenic acid sigma*), hidroxibenzoico (4 - *hydroxybenzoic acid sigma*), cafeico (*caffeic acid sigma*), siríngico (*syringic acid sigma*), vanilina (*vanillin sigma*), cumárico (*p-coumaric acid sigma*) e ferúlico (*ferulic acid fwka*).

Uma alíquota de 0,5mL dos extratos foi ressuspensa em metanol: água (1:1). Esta mistura foi usada para injeção em um cromatógrafo líquido (Shimadzu, Tóquio, Japão, CLASS-M10A), juntamente com um detector UV, usando um inversor C18 coluna de fase (4,6 x 250mm, 5mg, Discovery, EUA). O HPLC-UV foi operado a uma taxa de fluxo de 0,7mL.min⁻¹, a 35 °C, usando um solvente isocrático constituído por metanol e água acidificada (ácido acético 1%) numa proporção de 20:80 (v/v) durante 25min, com detecção em 280nm durante 15min e 320nm durante 25min (SCAGLIONI, 2014).

4.3. Caracterização química dos óleos essenciais

A identificação dos compostos químicos presentes no óleo essencial foi realizada no LPPN/CCQFA-UFPel, seguindo o método de Santi et al. (2017), sendo os mesmos submetidos à análise cromatográfica em equipamentos de cromatografia gasosa acoplado com espectrofotometria de massa (GC-MS, Shimadzu QP2010) equipada com split e com uma coluna capilar Rtx-5MS Restek (30m x 0,25mm x 0,25microns). Foi utilizado Hélio como gás de arraste a um fluxo split de 1:50, na taxa de 1,2mL.min⁻¹ com fragmentos de impacto de elétrons a uma potência de 70eV. O volume da amostra injetada foi de 1µL. A temperatura do injetador foi de 250°C e da interface de 300°C, enquanto a temperatura do forno foi programada partindo de 40°C, seguido de um aumento de 10°C.min⁻¹ até 280°C, na qual permaneceu por 10min. Posteriormente, a temperatura foi aumentada a uma taxa de 10°C.min⁻¹ até 300°C durante um tempo total de 41min. A identificação dos compostos foi baseada no espectro de massas (em comparação com a biblioteca espectral NIST08), e nas concentrações apresentadas como porcentagens relativas da área de cada pico sobre a área total.

4.4. Determinação dos compostos fenólicos totais dos extratos vegetais

A quantificação de fenóis totais foi realizada no LAMCA/EQA-FURG, baseada na metodologia proposta por Scaglioni et al. (2014) apresentando algumas modificações. Foram adicionados em tubos de ensaio, 0,5mL de cada um dos extratos, 0,5mL de água destilada e 4,5mL de solução alcalina. Como controle negativo foi utilizado 1mL de água destilada e 4,5mL de solução alcalina. Após, os tubos foram colocados em banho maria a 40°C por 15min. Em seguida, foi adicionado a cada tubo 0,5mL de reagente Folin Ciocalteu diluído 1:2 que ficou em repouso durante 10min a temperatura ambiente. As amostras foram submetidas à leitura no espectrofotômetro Cary 100 Varian a 750nm. Uma curva padrão de ácido gálico foi utilizada. O teste foi realizado em triplicata.

4.5. Parâmetros analíticos

Os procedimentos de determinação fenólica foram previamente validados por seus limites de detecção e quantificação, linearidade, repetibilidade e recuperação (RIBANI et al., 2004), conforme mostrado na tabela 1, para as determinações cromatográficas. O limite de detecção (LOD) foi calculado em relação sinal-ruído na proporção de 3:1. O limite de quantificação (LOQ) foi estabelecido como três vezes o LOD.

Tabela 1. Parâmetros de calibração para a determinação de ácidos fenólicos por HPLC-UV* em extratos de *P. cattleianum* S. e *Eugenia uniflora* L.

N	Ácido fenólico	T.R. (min)	Curva analítica	Linearidade ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	% RSD	r^2	LOD ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
1	Gálico	5,16	$y = (0,741-0,754) \times 10^5$	0,36 - 3,6	3,8	0,998	0,12	0,36
2	Protocatecoico	6,71	$y = (0,475 - 0,867) \times 10^5$	0,81 - 8,1	3,1	0,999	0,27	0,81
3	Clorogênico	8,17	$y = (0,455 - 1,798) \times 10^5$	1,23 - 12,3	1,9	0,999	0,41	1,23
4	Hidroxibenzoico	9,4	$y = (0,480 - 0,989) \times 10^5$	0,96 - 9,6	1,5	0,999	0,32	0,96
5	Cafeico	10,9	$y = (0,824 - 0,203) \times 10^5$	0,72 - 7,2	1,7	0,999	0,24	0,72
6	Siríngico	12,21	$y = (0,903 - 4,186) \times 10^5$	0,75 - 7,5	1,8	0,999	0,25	0,75
7	Vanilina	13,8	$y = (1,265 - 2,199) \times 10^5$	0,54 - 5,4	1,7	0,999	0,18	0,54
8	Cumárico	17,92	$y = (1,512 - 1,119) \times 10^5$	0,57 - 5,7	2,1	0,999	0,19	0,57
9	Ferúlico	22,05	$y = (1,405 - 2.354) \times 10^5$	0,75 - 7,5	2,6	0,999	0,25	0,75

*Técnica de análise: High Performance Liquid Chromatography, Ultraviolet. N: número correspondente do ácido fenólico; T.R.: tempo de retenção; RSD: desvio padrão relativo; r^2 : coeficiente de determinação LOD: limite de detecção; LOQ: limite de quantificação.

5. Análises Microbiológicas

5.1. Condições de cultivo dos micro-organismos

As análises microbiológicas foram realizadas no LIPOA/UFPel. Para a execução do experimento, os micro-organismos que estavam mantidos em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI, Merck®) com glicerol 20% a temperatura de -20°C foram cultivados em BHI durante 16-18h à 37°C.

5.2. Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos

Para a avaliação do perfil de sensibilidade, os inóculos bacterianos foram padronizados a 0,5 de densidade óptica (DO) ($1,5 \times 10^8$ CFU.mL⁻¹), conforme determinado pela *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015b). Foi semeado 0,1mL do inóculo por semeadura em superfície, em placas contendo ágar Muller-Hinton (MH, Kasvi®), sobre as quais foram adicionados, assepticamente, os discos comerciais dos antimicrobianos. Foram utilizados no total 23 antimicrobianos, sendo 8 utilizados para todos os isolados e cepas padrão testadas (cloranfenicol (CLO, 30µg), nitrofurantoína (NIT, 300µg), norfloxacin (NOR, 10µg), ácido nalidíxico (NAL, 30µg), tetraciclina (TET, 30µg), gentamicina (GEN, 10µg), ciprofloxacina (CIP, 5µg) e ampicilina (AMP, 10µg)). Os antimicrobianos estreptomicina (EST, 10 µg), cefazolina (CFZ, 30µg), cefalotina (CFL, 30µg), ceftazidima (CAZ, 30µg) e levofloxacina (LVX, 5µg) foram utilizados para os isolados e cepas padrão de *Salmonella*, *E. coli* e *Listeria*, enquanto que, frente aos isolados de *Salmonella* utilizou-se amoxicilina (AMO, 10µg) e ceftriaxona (CRO, 30µg), sendo este último antimicrobiano também testado frente a *S. aureus*, juntamente com eritromicina (ERI, 15µg), sulfametaxol-trimetoprima (SUT, 25µg), penicilina (PEN, 10µg) e vancomicina (VAN, 30µg). Posteriormente, as placas foram incubadas por 24h a 37°C. Após os diâmetros dos halos de inibição foram medidos e os mesmos foram comparados com os valores especificados pelo CLSI (2012).

5.3. Potencial antimicrobiano (PA)

5.3.1. Óleos essenciais

O potencial antimicrobiano do óleo essencial de *P. cattleianum* S. foi realizado através da técnica de disco difusão, segundo a metodologia proposta pelo CLSI (2015a), com modificações. A partir de um cultivo em BHI por 18h a 37°C, de cada micro-organismo testado, foi preparado um inóculo bacteriano padronizado, em nível de turbidez de 0,5 de DO, os quais foram semeados (0,1mL) em placas de Petri contendo ágar Muller Hinton (MH, Kasvi[®]) pela técnica de semeadura em superfície, com o auxílio de *swabs* estéreis. Discos de papéis filtro estéreis de 5mm de diâmetro foram dispostos na superfície do ágar, sobre o inóculo semeado. Em seguida, 5µL do óleo essencial de *P. cattleianum* S. foi adicionado sobre os discos para a difusão do óleo no meio de cultivo. O teste não foi realizado com o óleo essencial de *E. uniflora* L. As placas foram incubadas a 37°C durante 24h. O experimento foi realizado em triplicata para cada isolado, sendo que papel filtro embebido com solução salina a 0,85%, foi utilizado como controle negativo e como controle positivo foi usado discos do antibiótico gentamicina (GEN, 10µg). O potencial antimicrobiano foi avaliado pela presença de um halo inibitório ao redor do disco contendo os óleos essenciais sobre os micro-organismos testados.

5.3.2. Extratos Vegetais

O potencial antimicrobiano de ambos os extratos vegetais, foi realizado através da técnica de difusão em ágar (BONA et al., 2014) com modificações. As culturas bacterianas foram cultivadas em BHI por 18h a 37°C. Após o período de incubação foi preparado um inóculo bacteriano padronizado, em nível de turbidez de 0,5 de DO, o qual foi semeado 0,1mL do inóculo em placas de Petri, contendo ágar MH, pela técnica de semeadura em superfície, com o auxílio de *swabs* estéreis. Posteriormente, foram adicionados 15µL de cada um dos extratos em poços (7mm de diâmetro) feitos no ágar. As placas foram incubadas a 37°C durante 24h. O experimento foi realizado em triplicata para cada isolado. Uma cavidade contendo 15µL de solução salina a 0,85% foi utilizada como controle negativo. O potencial

antimicrobiano foi avaliado pela presença de uma zona de inibição ao redor do poço contendo os extratos vegetais, sobre os micro-organismos testados.

5.4. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para determinar a CIM foi empregada a técnica de microdiluição em caldo de acordo com as normas instituídas pelo CLSI (2015b), com modificações. Para a realização do teste, foi usada uma microplaca de poliestireno estéril com 96 cavidades. O meio de cultivo utilizado foi o caldo BHI com agente emulsificante Tween 80 (Synth[®]) a 1% adicionado, com o objetivo de diminuir a tensão superficial no contato dos óleos essenciais e extratos vegetais (característica apolar/polar) com o meio de cultura (característica polar). Foram realizadas diluições seriadas de razão 2 (dois) dos óleos e dos extratos acrescidos ao meio de cultura. O óleo essencial de *E. uniflora* L. foi utilizado com concentrações variando de 270mg.mL⁻¹ a 1,6mg.mL⁻¹, o óleo essencial de *P. cattleianum* com 291,3mg.mL⁻¹ a 1,7mg.mL⁻¹, enquanto que o extrato metanólico de *E. uniflora* L. variou de 251,7mg.mL⁻¹ a 1,5mg.mL⁻¹ e o de *P. cattleianum* S. de 244,4mg.mL⁻¹ a 1,4mg.mL⁻¹. Como controle positivo foi utilizado o meio de cultivo com emulsificante Tween 80 e o inóculo bacteriano para analisar a viabilidade celular bacteriana e para controle negativo foi usado meio de cultivo com emulsificante, sem a presença do inóculo.

Em uma cavidade da microplaca, foi adicionado apenas um dos óleos essenciais ou extratos, para testar qualquer possibilidade de contaminação do mesmo. Para os inóculos bacterianos, os micro-organismos foram cultivados em tubos contendo BHI, com a intenção de atingir 0,5 de DO, sendo que 50µL deste inóculo foram inseridos em 4950µL de caldo BHI. Posteriormente, foram adicionados 50µL desta suspensão em todas as cavidades da placa, com exceção das que possuem o controle negativo, e apenas o óleo ou o extrato vegetal, obtendo-se concentrações finais de 3x10⁴ UFC/mL⁻¹. O experimento foi realizado em triplicata e a microplaca foi incubada a 37°C durante 24h.

Após a incubação, foram adicionado 20µL de Cloreto 2, 3, 5 – Trifeniltetrazólio (CTT, Vetec[®]) a 0,5% em todas as cavidades e incubou-se a placa durante 20min a 37°C. A alteração na coloração de amarelo para vermelho foi indicativo de atividade

metabólica bacteriana e a permanência da cor amarela mostra a ausência do crescimento bacteriano pela ação do óleo essencial ou extrato testado.

5.5. Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A partir dos resultados da CIM foi determinado a CBM, que é definida como a menor concentração do extrato vegetal onde não pode ser observado crescimento visível na subcultura. Foram retiradas alíquotas de 5 μ L, de cada uma das cavidades do ensaio da CIM, que após 24h de incubação apresentaram inibição no crescimento bacteriano e em seguida, foram repicadas em placas de *Brain Heart Infusion* Ágar (Acumedia[®]) e incubadas a 37°C por 24h. A ausência de crescimento bacteriano no meio de cultivo mostra indício de que o óleo essencial ou o extrato testado não apresenta atividade bacteriostática e sim ação bactericida.

6. Análise Estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$), com o auxílio do *software* STATISTICA versão 8.0 (StatSoft, França).

7. Manuscrito 1 – Atividade antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de *Psidium cattleianum* S. e *Eugenia uniflora* L. sobre patógenos de origem alimentar

Marcelle Oliveira Garcia^{1*}, Gabriele Benatto Delgado¹, Ivandra Ignês de Santi², Marcy Heli Rodrigues³, Rogério Antônio Freitag², Eliana Badiale Furlong³, Wladimir Padilha da Silva⁴, Rita de Cássia dos Santos da Conceição¹, Eliezer de Avila Gandra⁵, Eduarda Hallal Duval¹

¹Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal – Departamento de Veterinária Preventiva - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil

²Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais - Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil

³Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos - Escola de Química e Alimentos - Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande, RS, Brasil

⁴Laboratório de Microbiologia de Alimentos - Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Brasil

⁵Laboratório de Ciência dos Alimentos e Biologia Molecular - Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil

Autor correspondente

Marcelle Garcia

marcelle_garcia@hotmail.com

Manuscrito submetido no periódico Revista Frontiers in Microbiology

Qualis 2016 em Ciência de Alimentos: A1

Fator de Impacto: 4,076

ISSN: 1664-302X

Atividade antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de *Psidium cattleianum* S. e *Eugenia uniflora* L. sobre patógenos de origem alimentar

Resumo

As doenças transmitidas por alimentos são um grande problema de saúde pública. Nos últimos anos, estudos têm sido realizados com frutas nativas do Brasil e direcionados à descoberta de novos agentes antimicrobianos, provenientes de plantas, para que possam ser utilizados como antimicrobianos naturais por apresentarem compostos bioativos na sua composição. O objetivo deste estudo foi caracterizar quimicamente, avaliar e comparar a atividade antimicrobiana de óleos essenciais e extratos metanólicos de *Psidium cattleianum* S. (araçá) e *Eugenia uniflora* L. (pitanga) contra cepas padrão e isolados provenientes de alimentos cárneos de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*. Através da cromatografia gasosa acoplada a espectrofotometria realizada para os óleos essenciais foi identificado 21 compostos para *P. cattleianum* S., sendo o beta-cariofileno (20,40%) o principal e 14 constituintes para *E. uniflora* L. com o elixeno (24,47%) como majoritário. Já na caracterização química dos extratos utilizando cromatografia por HPLC-UV encontraram como ácidos fenólicos 2,95mg.g⁻¹ de ácido gálico (*E. uniflora* L.) e 2,08mg.g⁻¹ de ácido cafeico (*P. cattleianum* S.). Na determinação de compostos fenólicos totais, os resultados mostraram 1,72mg.g⁻¹ de fenóis totais para o extrato de *E. uniflora* L. e 7,1mg.g⁻¹ para *P. cattleianum* S.. A análise do perfil de sensibilidade das cepas e isolados mostrou que os isolados e cepa padrão de *Salmonella* apresentaram 100% de sensibilidade a pelo menos 4 antimicrobianos (estreptomicina, gentamicina, norfloxacina e levofloxacina), os isolados e a cepa padrão de *S. aureus* apresentaram 100% de sensibilidade frente a norfloxacina, ciprofloxacina e gentamicina; a cepa padrão e os isolados de *E. coli* foram sensíveis a onze dos dezesseis antimicrobianos avaliados; e a cepa e os isolados de *Listeria* apresentaram 100% de sensibilidade a cloranfenicol, gentamicina, trimetoprima e levofloxacina. Foram realizadas análises microbiológicas: potencial antimicrobiano, concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM), sendo que nos testes o óleo essencial de *E. uniflora* L. foi utilizado em concentrações variando entre 270mg.mL⁻¹ a 1,6mg.mL⁻¹, *P. cattleianum* entre 291,3mg.mL⁻¹ a 1,7mg.mL⁻¹. Já para os extratos, o extrato metanólico de *E. uniflora* L. variando entre 251,7mg.mL⁻¹ a 1,5mg.mL⁻¹ e o de *P. cattleianum* S. entre 244,4mg.mL⁻¹ a 1,4mg.mL⁻¹. Os resultados mostraram que as concentrações de CIM de 107,8mg.mL⁻¹ para o extrato de *E. uniflora* L., de 244,4mg.mL⁻¹ para o extrato de *P. cattleianum* S., 291,3 mg.mL⁻¹ para o óleo essencial de *P. cattleianum* S. e 54 mg.mL⁻¹ para o óleo de *E. uniflora* L. foram as concentrações que garantiram a inibição de todos os micro-organismos testados. O óleo essencial de *E. uniflora* L. foi o mais eficaz para inibir o crescimento de

bactérias de importância alimentar, pois apresentou a concentração de $54\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ como a menor concentração suficiente para inibir todas as bactérias testadas e $270\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ para eliminá-las.

Palavras-chave: conservante natural; DTA; alimentos cárneos; *Staphylococcus aureus*; *Escherichia coli*; *Salmonella* spp.; *Listeria* spp.

1. Introdução

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) são uma importante causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo, constituindo um problema de saúde pública e afetando o desenvolvimento econômico dos países (WHO, 2015). As doenças transmitidas por alimentos são geralmente de natureza infecciosa ou tóxica e causadas por bactérias, vírus, parasitas ou substâncias químicas, que entram no corpo através de alimentos contaminados ou água. As bactérias, pela sua diversidade e patogenia, constituem o grupo microbiano mais importante associado às DTA (WHO, 2017).

O controle das contaminações e alterações indesejáveis que ocorrem em alimentos, tradicionalmente envolve a aplicação de conservantes químicos, utilizados com frequência pelas indústrias para garantir a segurança microbiológica dos seus produtos (CALO et al., 2015; MACWAN et al., 2016). Contudo, seu uso tem sido reconhecido por causar alguns perigos à saúde humana, pois muitos destes agentes antimicrobianos químicos estão envolvidos em uma série de sintomas agudos (alergias) (ALVES; ABRANTES, 2003), incluindo alergias respiratórias (GUTIERREZ; BARRY-RYAN; BOURKE, 2009), carcinogenicidade, principalmente no trato gastrintestinal e colo-retal (RESENDE et al., 2006; GARÓFOLO, 2004), teratogenicidade e toxicidade, além de déficit de atenção e hiperatividade (POLÔNIO; PERES, 2009). Como consequência, os consumidores procuram substituir os conservantes artificiais por conservantes naturais, com a intenção de buscar alimentos livres desses agentes químicos (FALEIRO, 2011).

Há muitos anos produtos, derivados de plantas vêm despertando grande interesse nas pesquisas, por serem potencialmente úteis no controle e diminuição de micro-organismos que causam prejuízos nas indústrias de alimentos (SOUZA et al. 2011). As plantas da família Myrtaceae têm apresentado expressiva atividade antimicrobiana frente a diferentes micro-organismos (VICTORIA et al., 2012; BONA et al, 2014; SOLIMAN et al., 2016).

Diversos estudos vêm sendo desenvolvidos com a intenção de descobrir novos compostos, provenientes de plantas, que possam ser utilizados em produtos farmacêuticos, cosméticos e na indústria alimentícia, com o objetivo de utilizá-los como compostos com atividade antimicrobiana comparada à dos tradicionalmente utilizados, porém, com menor toxicidade, mais eficazes contra a resistência de micro-organismos patogênicos e com menor impacto ambiental (VICTORIA et al., 2012; BONA et al., 2014; SCUR et al. 2016; DANNEMBERG et al., 2016; SANTI et al., 2017).

A família Myrtaceae é constituída de diversos frutos, dentre eles o *P. cattleianum* S. e *Eugenia uniflora* L.. A espécie *P. cattleianum* S. (araçá amarelo) no Rio Grande do Sul, é comum na planície costeira, na Floresta Atlântica e, eventualmente, na Depressão Central (FRANZON, 2004; SANTOS et al., 2008; LISBOA; KINUPP; BARROS, 2011). Essas espécies são ricas em compostos fenólicos, ácido ascórbico e carotenos, geralmente relacionadas com propriedades biológicas importantes, tais como, o aumento da proteção contra oxidação celular, atividade antimicrobiana e anti-carcinogênica (PROTEGGENTE et al., 2002; SUN et al., 2002).

A espécie *Eugenia uniflora* L. (pitanga) é um fruto nativo do Brasil, encontra-se disseminada, praticamente, por todo o território nacional e em diversas partes do mundo, em função da adaptação às diferentes condições de solo e clima (LIRA JÚNIOR et al., 2007). O fruto e as folhas são fontes de compostos potencialmente bioativos como compostos fenólicos e carotenóides (LIMA; MÉLO; LIMA, 2002;

MASSARIOLI et al., 2013), que apresentam potenciais efeitos benéficos à saúde humana.

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi caracterizar quimicamente, avaliar e comparar a atividade antimicrobiana de óleos essenciais e extratos metanólicos de *Psidium cattleianum* S. (araçá) e *Eugenia uniflora* L. (pitanga) contra cepas padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 12900, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e contra isolados de *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella* spp. e *Listeria* spp., provenientes de alimentos cárneos, obtidos na indústria e em estabelecimentos comerciais.

2. Materiais e Métodos

2.1. Coleta e identificação

As folhas e frutos de *E. uniflora* L. e *P. cattleianum* S. foram obtidas no pomar do Centro Agropecuário da Palma, UFPel, Pelotas (31°48'13"S e 52°30'30"W). Os frutos foram colhidos durante o mês de fevereiro de 2017 e as folhas em novembro de 2017. As amostras foram identificadas e o material vegetal armazenado no Herbário PEL lotado no Instituto de Biologia, Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, Rio Grande do Sul, e identificados pelos seguintes números de exsicata: *Psidium cattleianum* S. (PEL N° 26970) e *Eugenia uniflora* L. (PEL N° 26971).

2.2. Extratos vegetais e óleos essenciais

Os frutos foram congelados em ultrafreezer (-70°C), liofilizados, macerados e em seguida foi preparado um extrato a base de metanol utilizando o método de Scaglioni et al. (2014). Para os óleos essenciais (OE) as folhas foram secas em estufa com circulação de ar (37°C) e posteriormente trituradas em moinho de facas. A extração dos óleos foi realizada segundo a Farmacopeia Brasileira (BRASIL,

2010), utilizando o processo de hidrodestilação por arraste a vapor com o auxílio do equipamento Clevenger durante 4h.

2.3. Micro-organismos avaliados e condições de cultivo

Foram utilizadas quatro bactérias padrão, sendo elas *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 12900 e *Listeria monocytogenes* ATCC 7644. Além das cepas padrão foram utilizadas para os ensaios três isolados de *Salmonella* spp. provenientes de *beef jerky* (S1, S2 e S3), três de *Escherichia coli* isoladas de frango a granel (EC4, EC5 e EC6), três de *Staphylococcus aureus* isoladas de peixe salgado (SA7, SA8 e SA9) e cinco de *Listeria* sp. isoladas de carne bubalina (L10, L11, L12, L13 e L14). Os isolados foram cultivados por 16-18h a 37°C a partir de estoques mantidos em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI, Merck®) e glicerol.

2.4. Caracterização química dos extratos e óleos essenciais

A identificação dos ácidos fenólicos nos extratos seguiu a metodologia de Scaglioni et al. (2014) e foi realizada utilizando padrões de referência obtidos da Sigma - Aldrich, tais como: gálico (*gallic acid sigma*), protocatecoico (3 – 4 - *dihidroxibenzoico*), clorogênico (*chlorogenic acid sigma*), hidroxibenzoico (4 – *hydroxybenzoic acid sigma*), cafeico (*caffeic acid sigma*), siríngico (*syringic acid sigma*), vanilina (*vanillin sigma*), cumérico (*p-coumaric acid sigma*) e ferúlico (*ferulic acid fwka*).

A identificação dos compostos químicos presentes no OE foi realizada usando à análise cromatográfica em equipamentos de cromatografia gasosa acoplado com espectrofotometria de massa (GC-MS) (SANTI et al., 2017), utilizando a biblioteca espectral NIST08 como padrão de referência.

2.5. Determinação dos compostos fenólicos totais dos extratos vegetais

A quantificação de fenóis totais foi baseada na metodologia proposta por Scaglioni et al. (2014), baseado no método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu

utilizando o ácido gálico como padrão de referência. O teste foi realizado em triplicata.

2.6. Parâmetros analíticos

Os procedimentos de determinação fenólica foram previamente validados por seus limites de detecção e quantificação, linearidade, repetibilidade e recuperação (RIBANI et al., 2004), conforme mostrado na tabela 1, para a determinação cromatográfica, usando diferentes padrões. O limite de detecção (LOD) foi calculado em relação sinal-ruído na proporção de 3:1. O limite de quantificação (LOQ) foi estabelecido como três vezes o LOD.

Tabela 1. Parâmetros de calibração para a determinação de ácidos fenólicos por HPLC-UV* em extratos de *P. cattleianum* S. e *Eugenia uniflora* L.

N	Ácido fenólico	T.R. (min)	Curva analítica	Linearidade ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	% RSD	r^2	LOD ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
1	Gálico	5,16	$y = (0,741-0,754) \times 10^5$	0,36 - 3,6	3,8	0,998	0,12	0,36
2	Protocatecoico	6,71	$y = (0,475 - 0,867) \times 10^5$	0,81 - 8,1	3,1	0,999	0,27	0,81
3	Clorogênico	8,17	$y = (0,455 - 1,798) \times 10^5$	1,23 - 12,3	1,9	0,999	0,41	1,23
4	Hidroxibenzoico	9,4	$y = (0,480 - 0,989) \times 10^5$	0,96 - 9,6	1,5	0,999	0,32	0,96
5	Cafeico	10,9	$y = (0,824 - 0,203) \times 10^5$	0,72 - 7,2	1,7	0,999	0,24	0,72
6	Siríngico	12,21	$y = (0,903 - 4,186) \times 10^5$	0,75 - 7,5	1,8	0,999	0,25	0,75
7	Vanilina	13,8	$y = (1,265 - 2,199) \times 10^5$	0,54 - 5,4	1,7	0,999	0,18	0,54
8	Cumárico	17,92	$y = (1,512 - 1,119) \times 10^5$	0,57 - 5,7	2,1	0,999	0,19	0,57
9	Ferúlico	22,05	$y = (1,405 - 2.354) \times 10^5$	0,75 - 7,5	2,6	0,999	0,25	0,75

*Técnica de análise: High Performance Liquid Chromatography, Ultraviolet. N: número correspondente do ácido fenólico; T.R.: tempo de retenção; RSD: desvio padrão relativo; r^2 : coeficiente de determinação LOD: limite de detecção; LOQ: limite de quantificação.

2.7. Análises microbiológicas

2.7.1. Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos

Para a avaliação do perfil de sensibilidade, os inóculos bacterianos foram padronizados a 0,5 de densidade óptica (DO) ($1,5 \times 10^8$ CFU.mL⁻¹), conforme determinado pela *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015b). Foi semeado 0,1mL do inóculo por semeadura em superfície, em placas contendo ágar Muller-Hinton (MH, Kasvi[®]), sobre as quais foram adicionados, assepticamente, os discos comerciais dos antimicrobianos. Foram utilizados no total 23 antimicrobianos, sendo 8 utilizados para todos os isolados e cepas padrão testadas (cloranfenicol (CLO, 30µg), nitrofurantoína (NIT, 300µg), norfloxacina (NOR, 10µg), ácido nalidíxico (NAL, 30µg), tetraciclina (TET, 30µg), gentamicina (GEN, 10µg), ciprofloxacina (CIP, 5µg) e ampicilina (AMP, 10µg)). Os antimicrobianos estreptomicina (EST, 10 µg), cefazolina (CFZ, 30µg), cefalotina (CFL, 30µg), ceftazidima (CAZ, 30µg) e levofloxacina (LVX, 5µg) foram utilizados para os isolados e cepas padrão de *Salmonella*, *E. coli* e *Listeria*, enquanto que, frente aos isolados de *Salmonella* utilizou-se amoxicilina (AMO, 10µg) e ceftriaxona (CRO, 30µg), sendo este último antimicrobiano também testado frente a *S. aureus*, juntamente com eritromicina (ERI, 15µg), sulfametaxol-trimetoprima (SUT, 25µg), penicilina (PEN, 10µg) e vancomicina (VAN, 30µg). Posteriormente, as placas foram incubadas por 24h a 37°C. Após os diâmetros dos halos de inibição foram medidos e os mesmos foram comparados com os valores especificados pelo CLSI (2012).

2.7.2. Potencial antimicrobiano (PA)

2.7.2.1. Óleos essenciais

Para o potencial antimicrobiano do OE de *P. cattleianum* S. foi utilizado a técnica de disco difusão (CLSI, 2015a), com modificações, no qual os inóculos bacterianos também foram padronizados a 0,5 de DO e em seguida foi

espalhado 0,1 mL em placas contendo ágar MH. Foram adicionados na placa discos de papel filtro (5mm de diâmetro) com 5µL de OE de *P. cattleianum* S. (bruto). O teste não foi realizado com o OE de *E. uniflora* L.

O experimento foi realizado em triplicata para cada isolado, sendo que papel filtro embebido com solução salina a 0,85%, foi utilizado como controle negativo e como controle positivo foi usado discos do antibiótico gentamicina (GEN, 10µg). As placas foram incubadas a 37°C durante 24h. O diâmetro da zona de inibição do crescimento bacteriano foi medido.

2.7.2.2. Extratos Vegetais

O potencial antimicrobiano de ambos extratos vegetais, foi realizado através da técnica de difusão em ágar (BONA et al., 2014) com modificações. Foram adicionados 15µL de cada um dos extratos em poços (7mm de diâmetro) feitos no ágar. As placas foram incubadas a 37°C durante 24h. O experimento foi realizado em triplicata. O diâmetro da zona de inibição do crescimento bacteriano foi medido.

2.7.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para determinar a CIM, utilizou-se a técnica de microdiluição em caldo (CLSI, 2015b) e foram realizadas diluições seriadas de razão 2 (dois) dos OE e dos extratos, acrescidos ao meio de cultura para obter concentrações finais para o óleo essencial de *E. uniflora* L. variando de 270mg.mL⁻¹ a 1,6mg.mL⁻¹, óleo essencial de *P. cattleianum* com 291,3mg.mL⁻¹ a 1,7mg.mL⁻¹, enquanto o extrato metanólico de *E. uniflora* L. variando de 251,7mg.mL⁻¹ a 1,5mg.mL⁻¹ e o de *P. cattleianum* S. de 244,4mg.mL⁻¹ a 1,4mg.mL⁻¹. A cada cavidade foram adicionados 50µL de caldo BHI (Merck®) com 1% de Tween 80 (Sigma®) e 50µL do inóculo bacteriano. Para avaliar qualquer possível contaminação do meio de cultura, apenas o BHI com Tween 80 (controle negativo) foi usado e, como controle positivo, foi utilizado o meio com Tween 80 e cultura dos microorganismos. As diluições decimais em série subseqüentes foram realizadas até 3×10⁴ UFC/mL⁻¹. As placas foram incubadas a 37°C durante 24h. Após a incubação, foi adicionado 20µL de Cloreto 2, 3, 5 – Trifeniltetrazólio (Vetec®) a

0,5%. As placas foram incubadas a 37°C durante 20min. O resultado do teste foi alcançado observando a reação de cor. A mudança de cor (cor vermelha) foi indicativa da atividade metabólica bacteriana.

2.7.4. Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A partir das cavidades que apresentaram inibição de crescimento do micro-organismos no teste de CIM, foram coletadas alíquotas de 5µL, transferidas para ágar BHI e incubadas a 37°C durante 24h. Em casos em que não houve crescimento bacteriano no meio de cultura, pode-se observar que os extratos e OE testados mostrou atividade bactericida, mas não bacteriostática.

2.7.5. Análise Estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$), com o auxílio do *software* STATISTICA versão 8.0 (StatSoft, França).

3. Resultados

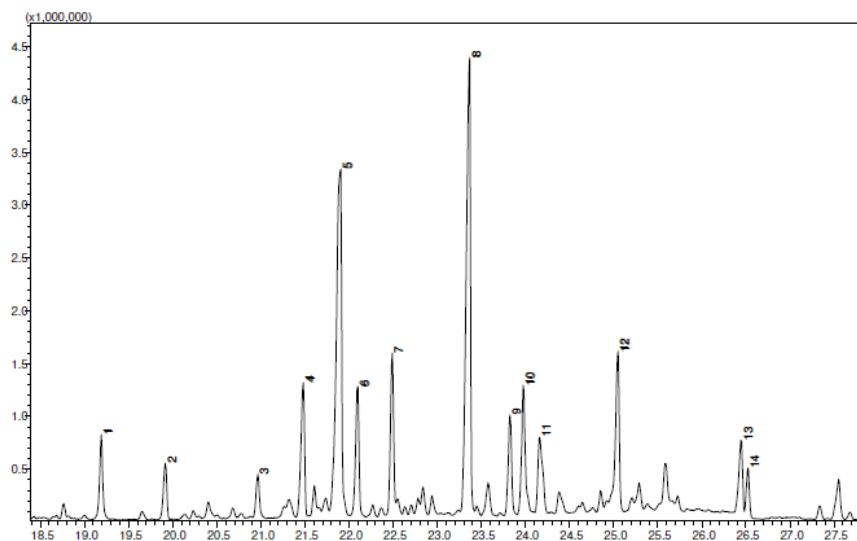
3.1. Caracterização química dos extratos metanólicos e dos óleos essenciais

A predominância de diferentes compostos fenólicos pode ser observada nas espécies de plantas da família Myrtaceae analisadas. O extrato de *E.uniflora* L. apresentou o ácido gálico ($2,95\text{mg.g}^{-1}$) e o ácido protocatecólico ($2,08\text{mg.g}^{-1}$), respectivamente, como compostos majoritários, seguidos do composto ácido cumárico ($0,075\text{mg.g}^{-1}$). Para o extrato de *P. cattleianum* S. foi possível observar três ácidos fenólicos na sua composição, sendo eles, ácido cafeico ($0,775\text{mg.g}^{-1}$), ácido clorogênico ($0,625\text{mg.g}^{-1}$) e ácido gálico ($0,2\text{mg.g}^{-1}$).

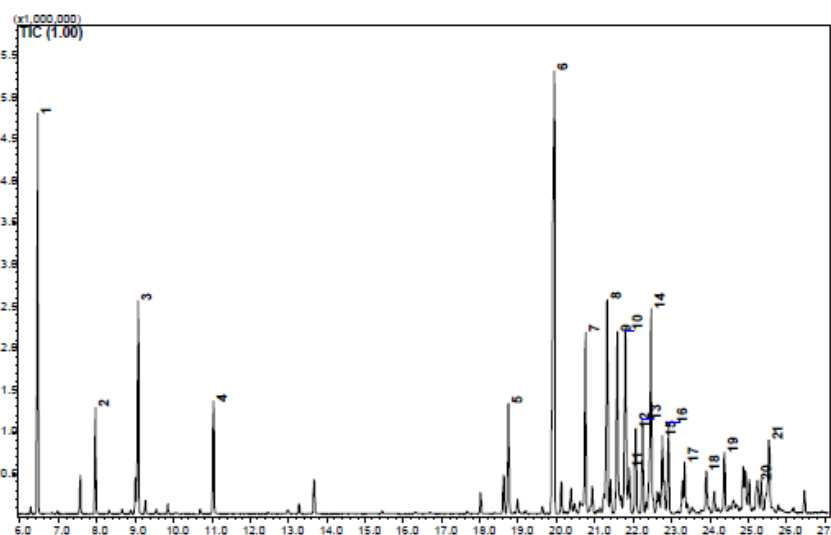
A caracterização química dos OE por cromatografia gasosa com espectrometria de massa (GC-MS) identificou 21 (vinte e um) compostos para o óleo de *P. cattleianum* S. e 14 (quatorze) compostos para o de *E. uniflora* L.

(Tabela 2). O beta-cariofileno foi o principal composto encontrado, representando 20,40% do total de compostos do óleo de *P. cattleianum* S., seguido dos compostos alfa-pineno (10,10%), delta-cadineno (7,38%) e germacreno D (7,21%). Já o OE de *E. uniflora* L. apresentou o composto elixeno como composto majoritário, com 24,47%, seguido do composto gama-elemeno (24,16%). Foi possível verificar neste óleo, a presença dos compostos beta-cariofileno (2,35%) e germacreno D (5,88%), porém, em uma porcentagem muito menor quando comparada ao OE de *P. cattleianum* S.. A Figura 1 apresenta os cromatogramas com os picos relativos aos compostos extraídos de cada um dos OE das plantas estudadas por GC-MS.

Os testes de cromatografia, utilizando GC-MS, evidenciaram nos dois OE a presença da maior classe de compostos voláteis pertencente a hidrocarbonetos terpênicos.



(A)



(B)

Figura 1. Cromatograma representativo dos picos relativos aos compostos dos óleos essenciais de folhas das plantas (A) *E. uniflora* L. e (B) *P. cattleianum* S. por GC-MS. Os compostos encontrados em cada uma das plantas estão representados pelos devidos picos (A) *E. uniflora* L. = 1: beta-elemeno, 2: beta-cariofileno, 3: alloaromadendrene, 4: germacreno D, 5: gama-elemeno, 6: eremofileno, 7: beta-cadineno, 8: elixeno, 9: spathulenol, 10: ledol, 11: aromandendreno, 12: não identificado, 13: etenil – 4,5,6,7 – tetra-hidro, 14: germacreno. (B) *P. cattleianum* S. = 1: alfa-pineno, 2: beta-mirceno, 3: p-cineole, 4: beta-linalol, 5: alfa-cubebeno, 6: beta-cariofileno, 7: alfa-cariofileno, 8: germacreno D, 9: beta-selineno, 10: alfa-selineno, 11: alfa-muuroleno, 12: alfa-himachaleno, 13: gama-muuroleno, 14: delta-cadineno, 15: valenceno, 16: Selina – 3,7 (11)-dieno, 17: trans-nerolidol, 18: óxido de cariofileno, 19: palustrol, 20: delta-cadinol, 21: selina-6-em-4-ol.

Tabela 2. Compostos químicos encontrados nos óleos essenciais das folhas de plantas de *Eugenia uniflora* L. e *P. cattleianum* S. realizados por cromatografia gasosa acoplada a espectrofotometria de massa (GC-MS).

<i>P. cattleianum</i> S.				<i>Eugenia uniflora</i> L.			
Pico	Nome do composto	Área %	T.R.* (min)	Pico	Nome do composto	Área %	T.R.* (min)
1	Alfa-pineno	10.10	6.456	1	Beta-elemeno	2.97	19.191
2	Beta-mirceno	2.61	7.962	2	Beta-cariofileno	2.35	19.916
3	p-cineole	4.69	9.075	3	Alloaromadendrene	1.72	20.965
4	Beta-linalol	3.28	11.046	4	Germacreno D	5.88	21.480
5	Alfa-cubebeno	3.43	18.746	5	Gama-elemeno	24.16	21.904
6	Beta-cariofileno	20.40	19.940	6	Eremofileno	5.26	22.097
7	Alfa-cariofileno	6.00	20.758	7	Beta-cadineno	6.28	22.490
8	Germacreno D	7.21	21.321	8	Elixeno	24.47	23.363
9	Beta-selineno	6.82	21.586	9	Spathulenol	4.03	23.825
10	Alfa-selineno	7.00	21.801	10	Ledol	6.09	23.978
11	Alfa-Muuroleno	1.53	21.896	11	Aromandendreno	4.27	24.161
12	Alfa-Himachaleno	2.84	22.063	12	N.I.	7.13	25.047
13	Gama-Muuroleno	2.66	22.243	13	Benzofurano, 6-etenil - 4,5,6,7-tetra-hidro	3.45	26.445
14	Delta-Cadineno	7.38	22.468	14	Germacreno	1.94	26.522
15	Valenceno	2.22	22.761				
16	Selina-3,7(11)-dieno	3.04	22.917				
17	Trans-Nerolidol	1.28	23.344				
18	Óxido de Cariofileno	1.46	23.910				
19	Palustrol	1.87	24.383				
20	Delta-cadinol	1.18	25.245				
21	Selina-6-en-4-ol	3.00	25.546				
		100.0				100.0	

*T.R.:Tempo de retenção; N.I.: Não identificado

3.2. Determinação dos compostos fenólicos totais dos extratos vegetais

A determinação do teor de fenóis totais dos extratos vegetais foi realizada utilizando extratos feitos a partir dos frutos secos, das duas plantas testadas. Os resultados mostraram $1,72\text{mg.g}^{-1}$ de fenóis totais para o extrato de *E. uniflora* L. e $7,1\text{mg.g}^{-1}$ para o extrato de *P. cattleianum* S..

3.3. Atividade Antimicrobiana

3.4. Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos

No teste do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos foi possível observar que a cepa padrão *S. Typhimurium* ATCC 14028 e os três isolados testados apresentaram 100% de sensibilidade a pelo menos quatro antimicrobianos (estreptomicina, gentamicina, norfloxacina e levofloxacina) e 100% de resistência a dois antimicrobianos (amoxicilina e cefazolina).

Os isolados de *S. aureus* e a cepa padrão *S. aureus* ATCC 25923 apresentaram um elevado nível de resistência a antimicrobianos, mostrando 100% de resistência a, pelo menos, seis antimicrobianos (eritromicina, trimetoprima, sulfametaxol-trimetoprima, clindamicina, penicilina e ceftriaxona), o que caracteriza um perfil de multirresistência. Apenas quando testados frente a norfloxacina, ciprofloxacina e gentamicina os micro-organismos mostraram 100% de sensibilidade. Os isolados e a cepa padrão de *E. coli*, apresentaram 100% de sensibilidade frente a onze dos dezesseis antimicrobianos testados (cloranfenicol, nitrofurantoína, sulfazotrim, norfloxacina, ácido nalidíxico, tetraciclina, gentamicina, trimetoprima, ciprofloxacina, ceftazidima e levofloxacina). Já, ao analisar os cinco isolados de *Listeria* spp. e a cepa *L. monocytogenes* ATCC 7644 foi possível verificar 100% de sensibilidade frente a quatro antimicrobianos testados (cloranfenicol, gentamicina, trimetoprima e levofloxacina).

3.5. Potencial antimicrobiano (PA), concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)

No potencial antimicrobiano, realizado para os extratos metanólicos utilizando o método de difusão em ágar, foi possível observar que 80% (8/10) das bactérias Gram-positivas (*S. aureus* ATCC 25923, SA7, *L. monocytogenes* ATCC 7644, L10, L11, L12, L13 e L14) testadas foram sensíveis ao extrato de *E. uniflora* L.. Dentre os isolados de *S. aureus*, 66,7% (2/3) (S8 e S9) apresentaram halos de inibição ao extrato de *E. uniflora* L., da mesma maneira que este extrato não mostrou ação frente às bactérias Gram-negativas (*S. Typhimurium* ATCC 14028, S1, S2, S3, *E. coli* O157:H7 NCTC 12900, EC4, EC5 e EC6) .

Para o extrato de *P. cattleianum* S., foi observado que houve uma melhor atividade antimicrobiana quando testado contra as bactérias Gram-negativas, pois todos os isolados, e inclusive as cepas padrão, apresentaram zona de inibição. Já para as cepas padrão e para os isolados de Gram-positivas testadas, apenas 30% (3/10) foram sensíveis a esse extrato, sendo elas *S. aureus* ATCC 25923 e os isolados SA8 e L11.

Em relação ao óleo essencial de *P. cattleianum* S., utilizando o método de disco difusão, verificou-se 75% (6/8) dos micro-organismos Gram-positivos testados, sensíveis a este óleo, apresentando-se apenas os isolados SA8 e L11, resistentes. O OE de *P. cattleianum* S. não mostrou atividade frente às Gram-negativas.

As médias dos halos de inibição, para os dois extratos testados e para o óleo essencial de *P. cattleianum* S., variaram entre 5,6 e 12,6mm de diâmetro (Tabela 3). Os isolados testados não apresentaram diferença significativa, ($p < 0,05$), quando comparadas a suas respectivas cepas padrão. Já as médias das zonas de inibição observadas para o controle positivo, que utilizou o antibiótico gentamicina para cada um dos micro-organismos foram as seguintes: *Salmonella* spp. (18,75mm), *S. aureus* (18,75mm), *E. coli* (16,5mm) e *Listeria* spp. (21mm).

A CIM dos extratos de *E. uniflora* L. variou de 24,4 a 107,8mg.mL⁻¹ entre todos os micro-organismos testados. O isolado L12 apresentou a menor

CIM ($24,4\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) para este extrato, seguido de *S. aureus* ATCC 25923, SA8 e SA9 com CIM de $50,3\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Os demais micro-organismos testados (*S. Typhimurium* ATCC 14028, S1, S2, S3, *E. coli* O157:H7 NCTC 12900, EC4, EC5, EC6, SA7, *L. monocytogenes* ATCC 7644, L10, L11, L13 e L14) apresentaram CIM de $107,8\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, sendo esta a menor concentração capaz de inibir todos os micro-organismos testados. Nos intervalos de concentrações avaliados, apenas três cepas padrão (*S. Typhimurium* ATCC 14028, *E. coli* O157H7 NCTA 12900, *S. aureus* ATCC 25923) e um isolado de *Listeria* sp (L12), apresentaram CBM nos intervalos de concentrações avaliados ($251,7\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$).

A CIM dos extratos de *P. cattleianum* S. entre todos os micro-organismos testados variou de $48,9$ a $244,4\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. *E. coli* O157:H7 NCTC 12900 e *L. monocytogenes* ATCC 7644 e os isolados EC4, EC6, L11, L13 e L14 apresentaram a maior concentração de CIM ($244,4\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) quando testadas frente a este extrato. Já *S. Typhimurium* ATCC 14028 e os isolados S1, S2, S3, acompanhados dos isolados EC5, SA9, L10 e L12, atingiram CIM de $104,7\text{mg}/\text{mL}$. *S. aureus* ATCC 25923 e os isolados SA7 e SA8 mostraram a menor concentração de CIM ($48,9\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Avaliando os resultados encontrados para o extrato de *P. cattleianum* S. frente a todos os micro-organismos testados, a melhor concentração de inibição foi de $244,4\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Embora as CIM tenham variado entre os micro-organismos, quando analisado a CBM, nenhuma das concentrações teve a capacidade bactericida, sendo capazes apenas de inibir o crescimento dos micro-organismos.

O OE de *E. uniflora* L. apresentou as menores concentrações de CIM quando comparado aos testes realizados com o OE de *P. cattleianum* S. e ambos extratos testados. Sendo assim, podemos considerá-lo como o melhor antimicrobiano avaliado neste trabalho. Apresentou CIM variando de $6,4$ a $54\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ entre todas as bactérias testadas, porém as CBM apresentaram-se com valores mais altos (54 a $270\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). *E. coli* O157:H7 NCTC 12900 foi inibida com a menor CIM ($6,4\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), atingindo $54\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de CBM. Na sequência, *S. aureus* ATCC 25923 e dois isolados de *Listeria* sp. (L10 e L11) apresentaram CIM de $12,9\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e CBM de $270\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Os isolados de *S.*

aureus (SA7, SA8, SA9) juntamente com os isolados de *Salmonella* (S1, S2, S3) e de *E. coli* (EC4), mais a cepa padrão *S. Typhimurium* ATCC 14028 apresentaram 26,1mg.mL⁻¹ de CIM, enquanto que apenas três micro-organismos testados (*L. monocytogenes* ATCC 7644, EC5 e EC6) apresentaram a concentração mais alta do OE, concentração essa de 54mg/mL, sendo a concentração inibitória mínima quando analisada contra todos os isolados e cepas padrão testadas no estudo.

Já o OE de *P. cattleianum* S. não mostrou atividade antimicrobiana nas concentrações analisadas frente à cepa padrão e isolados de *Salmonella*. Para *E. coli* O157:H7 NCTA 12900 verificou-se CIM de 124,8mg.mL⁻¹. Já, contra os isolados de *E. coli*, não houve valores de CIM nas concentrações avaliadas. Em relação aos isolados de *S. aureus* e *Listeria* sp., foi verificada ação antibacteriana com CIM de 124,8 a 291,3mg.mL⁻¹ e CBM com a maior concentração testada (291,3mg.mL⁻¹).

A CIM dos extratos e dos óleos variaram de 6,4 a 291,3mg/mL, e a CBM de 54 a 291,3mg.mL⁻¹, conforme demonstrado na Tabela 3.

Ao comparar o extrato e o OE de *P. cattleianum* S. pode-se perceber que o extrato obteve uma melhor ação, pois os mesmos apresentaram CIM menores frente a todas as bactérias testadas. *S. aureus* foi o micro-organismo que teve uma maior diferença entre as CIM quando se fez a comparação entre OE e extrato de *P. cattleianum* S.. Ao realizar o teste com OE foi possível observar CIM de 124,8mg.mL⁻¹ para *S. aureus* ATCC 25923, de 291,3mg.mL⁻¹ para os isolados SA7 e SA9. Não se observou CIM nas concentrações testadas para SA8, e quando analisado com o extrato apresentou valores mais baixos (48,9mg.mL⁻¹ para *S. aureus* ATCC 25923, SA7 e SA8, enquanto S9 obteve 104,7mg.mL⁻¹). Já quando se compara o OE e o extrato de *E. uniflora* L. verifica-se que o OE teve um maior potencial antimicrobiano, principalmente quando analisa-se a cepa padrão de *E. coli* com 107,8mg.mL⁻¹ de CIM frente ao extrato e 6,4mg.mL⁻¹ de CIM quando testada frente ao óleo.

Tabela 3. Atividade antimicrobiana dos extratos e óleos essenciais de *P. cattleianum* S. e de *E. uniflora* L. por potencial antimicrobiano (PA), concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) frente a micro-organismos patogênicos de origem alimentar.

Micro-organismos	PA (mm)				CIM (mg.mL ⁻¹)				CBM (mg.mL ⁻¹)			
	EP	EA	OP	OA	EP	EA	OP	OA	EP	EA	OP	OA
<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028	-	11,333 ^A	ND	-	107,8	104,7	26,1	*	251,7	**	54	**
S1	-	11,667 ^A	ND	-	107,8	104,7	26,1	*	**	**	54	**
S2	-	12 ^A	ND	-	107,8	104,7	26,1	*	**	**	115,7	**
S3	-	12 ^A	ND	-	107,8	104,7	26,1	*	**	**	54	**
<i>Escherichia coli</i> O157H7 NCTA 12900	-	10,667 ^B	ND	-	107,8	244,4	6,4	124,8	251,7	**	54	**
EC4	-	12 ^A	ND	-	107,8	244,4	26,1	*	**	**	54	**
EC5	-	9,667 ^B	ND	-	107,8	104,7	54	*	**	**	270	**
EC6	-	10,667 ^B	ND	-	107,8	244,4	54	*	**	**	54	**
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	10,667 ^A	11,333 ^A	ND	8,6667 ^A	50,3	48,9	12,9	124,8	251,7	**	270	291,3
SA7	10,667 ^A	-	ND	5,6667 ^A	107,8	48,9	26,1	291,3	**	**	270	291,3
SA8	-	11,667 ^A	ND	-	50,3	48,9	26,1	*	**	**	270	**
SA9	-	-	ND	6,3333 ^A	50,3	104,7	26,1	291,3	**	**	270	**
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	10 ^A	-	ND	11,333 ^A	107,8	244,4	54	291,3	**	**	270	291,3
L10	10,333 ^A	-	ND	11 ^A	107,8	104,7	12,9	291,3	**	**	270	291,3
L11	9,667 ^A	9,333 ^A	ND	-	107,8	244,4	12,9	124,8	**	**	270	**

L12	7 ^A	-	ND	ND	24,4	104,7	ND	ND	251,7	**	ND	ND
L13	10,333 ^A	-	ND	ND	107,8	244,4	ND	ND	**	**	ND	ND
L14	10,333 ^A	-	ND	12,667 ^A	107,8	244,4	ND	124,8	**	**	ND	**

EP: Extrato de Pitanga (*E. uniflora* L.); EA: Extrato de Araçá (*P. cattleianum* S.); OP: Óleo essencial de Pitanga (*E. uniflora* L.); OA: Óleo essencial de Araçá (*P. cattleianum* S.); Os valores para PA são apresentados como médias (n = 3) ± desvio padrão; Letras diferentes em cada coluna indicam diferença significativa (P < 0.05) pelo teste de Tukey; ND: Não determinado; -: Não houve halo de inibição; *Não houve valores de CIM nos intervalos de concentrações avaliados; **Não houve valores de CBM nos intervalos de concentrações avaliados.

4. Discussão

Os OE das folhas de *E. uniflora* L. e *P. cattleianum* S. foram analisados por GC-MS. A maioria dos compostos identificados na composição química dos OE são da classe dos terpenoides. Estes são responsáveis por uma ampla gama de atividades biológicas, como antimicrobianos, antioxidantes, antiinflamatórios e antivirais, entre outros (BAKKALI et al., 2008).

No óleo de *P. cattleianum* S., os compostos majoritários encontrados foram o beta-cariofileno (20,40%), delta-cadineno (7,38%) e germacreno D (7,21%), da classe dos sesquiterpenos, e o constituinte alfa-pineno (10,10%), pertence aos monoterpenos. Os hidrocarbonetos monoterpênicos ou sesquiterpênicos e seus derivados oxigenados são considerados como potentes agentes antimicrobianos por muitos estudos (BAJPAI; SHARMA; BAEK, 2013; DIAO et al., 2014).

Soliman et al. (2016) ao analisarem folhas de *P. cattleianum* S. adquiridas no Egito, utilizando o método de GC-MS, identificaram 31 (trinta e um) compostos na sua composição química, sendo o beta-cariofileno (28,83%) o principal sesquiterpeno identificado, seguido de alfa-pineno (28,00%). Estes constituintes são os mesmos encontrados nas folhas de *P. cattleianum* S. no presente estudo.

Adam et al. (2011) examinaram OE das folhas dessa planta coletadas na Polinésia Francesa, por GC/MS e observaram que o óleo é muito rico em sesquiterpeno (48,8%) e monoterpênicos (10,1%). Neste estudo, o principal sesquiterpeno no óleo apresentado foi o beta-cariofileno (31,5%), sendo o mesmo composto encontrado por Biegelmeier et al. (2011), quando avaliaram OE de frutas e sementes de *Psidium cattleianum* (frutos vermelhos) e *Psidium cattleianum* var. *lucidum* (frutos amarelos), obtidos no banco de germoplasma mantido pelo Centro de Pesquisa da Embrapa Clima Temperado, localizado no município de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. Os autores encontraram beta-cariofileno, na proporção de 22,5% para o óleo dos frutos vermelho e 28,7% para os amarelos.

Em relação à determinação do teor de fenóis totais encontrado, os extratos de *P. cattleianum* S. apresentaram $7,1\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ na atual pesquisa. Frutos de *P. cattleianum* S. também adquiridos no Centro de Pesquisa da Embrapa Clima Temperado de Pelotas apresentaram conteúdos de compostos polifenólicos de $292,03\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$, segundo Biegelmeier e colaboradores (2011). Estes valores são mais altos do que os encontrados no presente estudo. Essas diferenças observadas em algumas pesquisas (BIEGELMEYER et al., 2011; CELLI, 2011) podem ocorrer devido a região geográfica que os frutos foram colhidos, assim como variações na maturação do fruto no momento que foram colhidas.

Já referente à composição de compostos fenólicos individuais, em nosso estudo, observamos que *P. cattleianum* S. apresentou como composto majoritário o ácido cafeico, diferente de Medina et al. (2011) que destacaram a epicatequina e o ácido gálico como os principais constituintes fenólico presentes em todos os genótipos investigados, tanto para frutos de *Psidium cattleianum* S. (fruto amarelo) quanto *Psidium cattleianum* S. (fruto vermelho).

Teixeira (2015) avaliou os compostos fenólicos dos frutos de *Psidium cattleianum* S. e observou que há uma variação significativamente entre os genótipos, em uma mesma safra, verificando nítida diferença entre frutos vermelhos e amarelos. Os frutos de *P. cattleianum* apresentaram alto teor de compostos fenólicos totais, variando entre $414,7$ e $689,67\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$. A epicatequina foi a molécula fenólica mais abundante presente nos frutos, seguida do ácido gálico, em todas os genótipos. O autor observou grande variabilidade tanto na composição quanto na quantidade de compostos fenólicos entre os genótipos de araçá e entre as safras avaliadas. Essa ampla variação pode ser explicada devida essas moléculas serem oriundas do metabolismo secundário das plantas (TEXEIRA, 2015).

Os valores discrepantes encontrados para os diferentes compostos fenólicos em plantas podem ser decorrentes da espécie, das características ambientais do cultivo, variedade da cultivar e maturação dos frutos, além da peculiaridade metodológica relacionada ao solvente extrator e ao polifenol usado como padrão para a quantificação dos compostos fenólicos (KARWOWSKI, 2012).

Em relação ao perfil de sensibilidade frente aos antimicrobianos, ao testar estreptomicina, gentamicina, norfloxacin e levofloxacin frente a cepa padrão *S.*

Typhimurium ATCC 14028 e isolados de *Salmonella* spp. verificou-se 100% (4/4) de sensibilidade. Schmidt & Cardoso (2003) em sua pesquisa encontraram uma baixa resistência a gentamicina 6,2% (1/13) para as cepas de *Salmonella* testadas. Dado este também observado por Ziech et al. (2014), tendo encontrado um percentual de 15% (15/98) a gentamicina e 19% (19/98) para estreptomicina.

Em relação aos isolados de *S.aureus* verificou-se resistência a seis antimicrobianos testados, mostrando 100% (4/4) de sensibilidade apenas quando testado para norfloxacina, ciprofloxacina e gentamicina. SÁNCHEZ et al. (2012), avaliando perfil de cepas de *S. aureus* isoladas de produtos de pesca, verificaram 100% (125/125) destas com sensibilidade à penicilina G, tetraciclina, cloranfenicol, vancomicina, clindamicina, eritromicina e gentamicina. Estes resultados diferem dos obtidos no presente estudo, sendo mais de 90% das cepas de *S. aureus* testadas resistentes a estes mesmos antimicrobianos, exceto em relação à gentamicina e cloranfenicol, quando verificou-se, respectivamente, 100% (4/4) e 25% (1/4) dos isolados sensíveis. A sensibilidade apresentada à norfloxacina no presente estudo, corrobora os resultados encontrados por MOURA et al. (2016), que também verificaram 100% (27/27) de sensibilidade quando avaliaram isolados de *S. aureus* provenientes de carne caprina, considerando este antimicrobiano o mais eficaz contra o patógeno.

Os isolados e cepa padrão de *E. coli* apresentaram 100% (4/4) de sensibilidade a cloranfenicol, nitrofurantoína, sulfazotrim, norfloxacina, ácido nalidíxico, tetraciclina, gentamicina, trimetoprima, ciprofloxacina, ceftazidima e levofloxacina. Altalhi; Gherbawy; Hassan (2010) testaram 37 (trinta e sete) isolados de *E. coli* provenientes de frango resfriado e observaram sensibilidade de 75,7% (28/37) frente a gentamicina, 67,6% (25/37) frente a cloranfenicol e 51,4% (19/37) frente a estreptomicina.

Em relação aos isolados de *Listeria* spp. e a cepa padrão, 100% apresentaram sensibilidade a cloranfenicol, gentamicina, trimetoprima e levofloxacina. Ainda, 83,3% (5/6) foram sensíveis a estreptomicina e a tetraciclina, indo de encontro aos resultados encontrados por Issa et al. (2011), onde foi verificado 100% (23/23) de micro-organismos sensíveis a estreptomicina, 52,1% (12/23) a cloranfenicol e 13% (3/23) a tetraciclina. No potencial antimicrobiano

realizado para os extratos metanólicos, utilizando o método de difusão em ágar, foi possível analisar que o extrato de *P. cattleianum* S. apresentou melhor atividade antimicrobiana quando testado contra as bactérias Gram-negativas, pois todos os isolados e inclusive as cepas padrão apresentaram zona de inibição (halo de inibição em milímetros): *S. Typhimurium* ATCC 14028: 11,3mm; S1: 11,6mm; S2: 12mm; S3: 12mm; *E. coli* O157:H7 NCTC 12900: 10,6mm; EC4: 12mm; EC5: 9,6mm; e EC6: 10,6mm. Estes resultados foram diferentes quando analisou-se em relação às bactérias Gram-positivas. Dentre as dez bactérias testadas, apenas três foram sensíveis a esse extrato (*S. aureus* ATCC 25923: 11,3mm; S8: 11,6mm; e L11: 9,3mm). Estes resultados vão de encontro aos apresentados por AMANCIO et al. (2015), pois ao testarem extratos hidroetanólicos de *P. cattleianum* contra *E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* ATCC 6538, verificaram que a bactéria Gram-positiva foi mais sensível, apresentando zonas de inibição de 24mm para extratos feitos com folhas verdes da planta e de 23mm com folhas secas, enquanto a cepa Gram-negativa apresentou halos de 10mm para folhas verdes e 9mm para as secas.

A ação antimicrobiana frente a bactérias Gram-negativas pode estar relacionada ao fato destas apresentarem uma camada extra de lipopolissacarídeos e proteínas na parede celular que formam uma barreira de permeabilidade a agentes antimicrobianos (FORSYTHE, 2013).

Extratos e OE obtidos de plantas pertencentes à família Myrtaceae apresentam atividade antimicrobiana frente a diferentes micro-organismos, sejam eles Gram-positivos ou Gram-negativos. Esta ação varia entre as espécies, os métodos de obtenção, partes da planta utilizada, época e local de coleta e os solventes empregados para a extração dos constituintes químicos das mesmas (SIMONETTI 2015).

Desoti et al. (2011) avaliaram extratos com mais de um solvente, com folhas de *Psidium cattleianum* var. *lucidum* (araçá amarelo - AA) e *P. cattleianum* var. *cattleianum* (araçá vermelho - AV) e observaram que o extrato metanólico apresentou CIM de $250\mu\text{g.mL}^{-1}$ (AA) e $125\mu\text{g.mL}^{-1}$ (AV) frente a *S. aureus* ATCC 6538. Foi apresentado CBM de $500\mu\text{g.mL}^{-1}$ apenas para *P. cattleianum* var. *cattleianum* (araçá vermelho), mas quando testado o mesmo extrato metanólico para *E. coli* ATCC 8739 e *S. typhi* IAL 1434, não foi verificado CIM para as

variedades testadas. Ao mesmo tempo, Medina et al. (2011), quando avaliaram frutas nativas do Brasil, como *Psidium cattleianum* S., verificaram que o extrato, tanto do fruto amarelo quanto do fruto vermelho, inibiu o crescimento de *S. Enteritidis* ATCC 13076 com 5% de concentração inibitória mínima (CIM).

Em uma pesquisa que analisou extratos etanólicos (EE), aquosos (EAq) e OE de *P. cattleianum*, os autores perceberam concentrações variáveis dos extratos e OE, quando analisados em relação a *S. Enteritidis*. Quando avaliado EE, verificaram CIM de 25mg.mL⁻¹ e CBM de 25mg.mL⁻¹ e quando avaliado o EAq, verificaram CIM de 50mg.mL⁻¹ e CBM de 50mg.mL⁻¹. Neste mesmo trabalho, para *E. coli* os valores encontrados foram 6,25mg.mL⁻¹ de CIM e 25mg.mL⁻¹ de CBM para o EE e 12,5mg.mL⁻¹ de CIM e 50mg.mL⁻¹ de CBM para EAq. Já, para *S. aureus*, os autores identificaram 3,125mg.mL⁻¹ de CIM e 3,125mg.mL⁻¹ de CBM para EE e 12,5mg.mL⁻¹ de CIM e 12,5mg.mL⁻¹ de CBM para EAq. Em relação ao OE de *P. cattleianum*, os três micro-organismos avaliados apresentaram CIM e CBM de 200mg.mL⁻¹ (SCUR et al., 2016). Em nosso estudo as concentração de OE de *P. cattleianum* S. foram menores (124,8mg.mL⁻¹) quando testadas frente a *S. aureus* ATCC 25923 e frente a *E. coli* O157:H7 NCTC 12900.

Simonetti (2015) avaliou extratos de *E. anomala* (uvaia-do-campo) e *Psidium salutare* var. sericeum (araçá-do-campo), ambas plantas pertencentes da família Myrtaceae, com quatro tipos de solventes (hexano, clorofórmio, acetato de etila e etanólico). Quando comparou os resultados obtidos dos extratos das duas espécies vegetais, observou que os extratos da espécie de *E. anomala* apresentaram melhor potencial de ação antimicrobiana frente a *E. coli*. O extrato etanólico apresentou CIM de 2.500µg.mL⁻¹ e CBM de 10.000µg.mL⁻¹, sendo o único extrato de ambas as espécies vegetais que apresentou ação bacteriostática e bactericida. Quando testado para *L. monocytogenes* observou que o extrato de *P. salutare* que apresentou CIM mais baixa, é o extrato clorofórmio, apresentando CIM de 1.250µg.mL⁻¹ e CBM de 10.000µg.mL⁻¹, seguido pelo extrato etanólico, o qual apresentou CIM de 2.500µg.mL⁻¹ e CBM de 10.000µg.mL⁻¹.

A ação antimicrobiana do extrato de *P. salutare* contra a *L. monocytogenes* pode estar relacionada ao fato das bactérias Gram-positivas serem mais sensíveis por apresentarem uma camada única na parede célula, diferente das bactérias

Gram-negativas que possuem uma camada dupla na sua parede celular, não permitindo que antimicrobianos entrem com facilidade matando o micro-organismo (FORSYTHE, 2013).

Quanto ao mecanismo de ação de OE e extratos nas células microbianas, esse ponto é bastante variável, pois considerando o grande número de diferentes grupos de compostos químicos presente em OE e extratos, é muito provável que sua atividade antimicrobiana não seja atribuída apenas a um mecanismo específico, e sim, a vários alvos na célula. A ação antimicrobiana de diferentes extratos OE tem sido atribuída aos componentes lipofílicos que apresentam capacidade de provocar danos a parede celular das bactérias, fazendo assim com que ocorra um desequilíbrio quimiosmótico entre o interior da célula e o meio externo, podendo ocorrer até mesmo o extravasamento de material celular, deste modo provocando a morte do micro-organismo (BURT, 2004).

No OE de *E. uniflora* L., os constituintes majoritários encontrados por GC-MS foram o elixeno (24,47%) e o gama-elemeno (24,16%), ambos da classe dos sesquiterpenos.

A composição química do OE de *E. uniflora* L. obtida neste estudo revelou que os sesquiterpenos são a classe dominante, corroborando as descobertas de muitos estudos anteriores (LAGO et al., 2011; VICTORIA et al., 2012; RODRIGUES et al., 2013).

Quanto à determinação do teor de fenóis totais, neste trabalho determinou-se para os extratos de *E. uniflora* L. $1,7\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de fenóis totais.

Bagetti (2009) quando avaliou extratos metanólicos de frutos de *E. uniflora* (adquiridos no Centro de Pesquisa da Embrapa Clima Temperado de Pelotas), percebeu teores de compostos fenólicos totais de pitanga roxa (463mg ácido gálico. 100g^{-1}), pitanga vermelha (210mg ácido gálico. 100g^{-1}) e pitanga laranja (179mg ácido gálico. 100g^{-1}), em concentrações maiores quando comparados ao presente estudo.

Extratos etanólicos de folhas de *E. uniflora*, coletadas em Juazeiro do Norte, Ceará, Brasil apresentaram $75,65\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de constituintes fenólicos totais (SOBRAL-SOUZA et al., 2014). ROCHA et al. (2011) quando avaliaram quatro espécies do gênero *Eugenia*, *E. dysenterica* (cagaita), *E. klotzchiana* (pera-do-cerrado), *E.*

punicifolia e *E. calcyna* (espécies de pitanga-do-cerrado), encontraram concentrações de teores fenólicos totais de 15,9mg.g⁻¹, 4,9mg.g⁻¹, 6,4mg.g⁻¹ e 0,7mg.g⁻¹, respectivamente, indicando a provável presença de compostos fenólicos simples, como os ácidos fenólicos.

Em uma pesquisa que analisou o teor total de compostos fenólicos no suco de *E. uniflora* L. (frutos roxos), foi encontrado aproximadamente 1.901,21mg de ácido gálico em 100g⁻¹ de suco (RUTZ, 2016). Dentre os compostos fenólicos identificados no suco, por cromatografia líquida de alta eficiência, os autores destacaram o ácido gálico como composto majoritário, com 1.063,32mg em 100g⁻¹ de suco, sendo este um ácido fenólico.

Karwowski (2012) identificou ácido gálico (1.056,16mg/kg⁻¹), ácido clorogênico (33,88mg.kg⁻¹), ácido cafeico (11,00mg.kg⁻¹), ácido p-cumárico (8,44mg.kg⁻¹) e ácido ferúlico (4,52mg.kg⁻¹) em frutos de *E. uniflora* L., sendo ácido gálico e ácido cumárico também encontrados neste trabalho, nas concentrações de 2,95mg.g⁻¹ e 0,075mg.g⁻¹, respectivamente. A quantificação e determinação dos compostos fenólicos é importante na classificação da fruta quanto ao teor desses e na elucidação de quais os compostos que poderiam estar desempenhando as atividades biológicas.

Silva et al. (2012) observaram atividade antimicrobiana ao testar extrato metanólico e OE de várias plantas, incluindo a planta *E. uniflora*, frente a isolados de *S. aureus* e *E. coli*. Os autores perceberam que o OE foi eficaz frente a *S. aureus* com CIM de 2,2mg.mL⁻¹ e que o extrato, na mesma concentração, mostrou ação para o isolado de *E. coli*. Este mesmo estudo encontrou compostos fenólicos no extrato de *E. uniflora* e constituintes da classe dos terpenoides nos OE de *E. uniflora*, quando realizada a caracterização química da planta. Estes autores afirmam que todos os compostos encontrados estão envolvidos com a propriedade antimicrobiana, juntamente com os fenóis.

Victoria et al. (2012) encontraram CIM de 0,8mg.mL⁻¹ para *S. aureus* e de 1,04mg.mL⁻¹ para *L. monocytogenes* quando testaram óleo essencial de *E. uniflora* L. Os resultados encontrados em nosso trabalho foram mais altos do que os apresentados por Victoria e colaboradores. Quando avaliado o extrato metanólico de *E. uniflora* L. em relação aos isolados e cepa padrão de *Listeria*, observou-se CIM

de 107,8mg.mL⁻¹ para 80% (4/5) das *Listerias* testadas, sendo que apenas o isolado L12 apresentou CIM de 24,4mg.mL⁻¹. O OE de *E. uniflora* S. apresentou CIM de 54mg.mL⁻¹ para a cepa de *L. monocytogenes* ATCC 7644 e de 12,9mg.mL⁻¹ para os isolados de *Listeria* (L10 e L11), sendo inferior apenas aos valores apresentados frente a cepa de *E. coli* O157:H7 NCTC 12900, que apresentou CIM de 6,4mg.mL⁻¹. Sendo assim, a concentração de 54mg.mL⁻¹ foi a menor capaz de inibir todos os micro-organismos testados.

Em outro estudo, ao avaliarem cepas de *E. coli* frente a extratos e OE de *E. uniflora*, notaram que o extrato bruto com 15,9mg.mL⁻¹ de CIM, teve o melhor efeito inibitório comparado ao OE (CIM= 27,6mg.mL⁻¹) da mesma planta (Silva et al., 2012). Além disso, encontraram na caracterização química do OE, compostos da classe dos terpenoides, que segundo BAKKALI e colaboradores (2008), possuem propriedades antimicrobianas.

Plantas da família Myrtaceae apresentam elevada concentração de terpenos sendo que há variação qualitativa e quantitativa considerável de terpenos foliares em população e indivíduos, sendo esta variação importante ecologicamente e industrialmente (KESZEI et al., 2010).

Quando se compara os resultados do nosso trabalho referente ao extrato e ao OE de *P. cattleianum* S., é possível verificar que o extrato obteve uma melhor ação, pois os mesmos apresentaram CIM menores frente a todas as bactérias testadas. Como se sabe, espécies de *P. cattleianum* S. são ricas em compostos fenólicos, e os mesmos foram encontrados na caracterização química dos frutos de *P. cattleianum* S., sendo que geralmente estes constituintes presentes estão relacionados com propriedades biológicas importantes, como a atividade antimicrobiana (PROTEGGENTE et al., 2002). Como os extratos apresentaram potencial superior aos OE, acredita-se que os fenóis encontrados na sua composição fitoquímica estão envolvidos com a propriedade antimicrobiana, juntamente com os outros compostos (BASSOLÉ; JULIANI, 2012).

Há muitos anos sabe-se que a composição fenólica das frutas é determinada por fatores ambientais, mas podem ser modificados por reações oxidativas durante o processamento e armazenamento. Os compostos fenólicos são metabolizados como uma resposta de defesa contra a intensa radiação solar e outros fatores adversos.

As variações nos frutos resultam da via de formação destes compostos, uma vez que a sua presença difere em cada fruta. Assim, os diferentes teores de fenólicos individuais em cada planta, faz com que os extratos produzam diferentes efeitos em relação às atividades biológicas (ROBARDS et al., 1999).

A atividade antimicrobiana de produtos fenólicos podem envolver vários modos de ação. Os fenóis também podem inibir a síntese de ácidos nucleicos de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (CUSHNIE; LAMB, 2005). Quanto ao efeito dos ácidos fenólicos sobre as propriedades superficiais físico-químicas das células bacterianas verificou-se que estes compostos alteraram a hidrofobicidade bacteriana. A atividade antimicrobiana dos ácidos fenólicos ocorre devido ao seu caráter parcialmente lipofílico, pois eles atravessam a membrana celular, perturbando a estrutura da membrana celular e acidificando o citoplasma, e por fim, causando a desnaturação de proteínas (CAMPOS et al., 2009). A ruptura da membrana celular por hiper acidificação é um potencial mecanismo para explicar a ação antimicrobiana de ácidos fenólicos contra micro-organismos.

Quando se compara os resultados do extrato e do OE de *E. uniflora* L., analisamos que o OE apresentou uma atividade antimicrobiana mais eficaz, pois atingiu as menores concentrações capaz de inibir o crescimento dos patógenos testados. Essa ação dos OE pode ocorrer devido à presença de compostos na sua composição química, sendo eles da classe dos terpenos.

A atividade antibacteriana de OE é conhecida e estudada há vários anos, porém, os mecanismos pelos quais desempenham esta ação ainda não são completamente conhecidos (CALO et al., 2015). A dificuldade em descrever um mecanismo de ação específico para os OE se dá em função da sua complexa composição química, onde estão presentes um grande número de moléculas ativas com estruturas distintas (BURT, 2004).

Apesar dos OE apresentarem compostos majoritário na sua composição, considera-se que eles possuam misturas complexas de terpenos, em vez de apenas um ou dois compostos. Outra vantagem das misturas de defesa é que os componentes individuais podem atuar de forma sinérgica para fornecer maior toxicidade do que a quantidade equivalente de uma única substância (GERSHENZON; DUDAREVA, 2007), além disso, acredita-se que a ação

antibacteriana dos OE aconteça em decorrência do ataque a diferentes alvos celulares (BURT, 2004).

O ataque à membrana citoplasmática bacteriana é um mecanismo que pode ser descrito para a totalidade dos componentes dos OE, em virtude de sua hidrofobicidade, porém, outros mecanismos e alvos são descritos pela literatura. Alterações na força próton motriz, no fluxo de elétrons, no transporte ativo, inibição da produção de energia (ATP) e a coagulação do conteúdo citoplasmático são outras formas de perturbação ao funcionamento normal das células bacterianas, causados pela ação de OE, que podem isoladamente e/ou em conjunto causar a inibição e morte da bactéria (BURT, 2004; RAI et al., 2017). De modo geral, o mecanismo de ação dos OE poderia ser descrito como uma cascata de reações que ocorrem em toda a célula bacteriana (MACWAN et al., 2016).

5. Conclusões

Os extratos e óleos essenciais testados apresentaram compostos em sua composição química que possuem atividade antimicrobiana como os da classe dos terpenos e os ácidos fenólicos. Os resultados deste estudo mostram que os extratos de *P. cattleianum* S. apresentaram melhor ação quando comparado ao OE da mesma planta e que o OE de *E. uniflora* apresentou CIM menores, em relação ao extrato. Sendo assim, OE de *E. uniflora* L. é mais eficaz para inibir o crescimento de bactérias de importância alimentar. Pode-se concluir que o OE de *E. uniflora* L na concentração de 54mg.mL⁻¹ seria suficiente para inibir todas as bactérias testadas, e na concentração de 270mg.mL⁻¹ para eliminá-las.

6. Referências

Adam F, Vahirua-Lechat I, Deslandes E, Menut, C. Aromatic plants of French Polynesia. V. Chemical composition of essential oils of leaves of *Psidium guajava* L. and *Psidium cattleianum* Sabine. Journal of Essential Oil Research, (2011) 23:98-101.

Altalhi AD, Gherbawy YA, Hassan SA. Antibiotic Resistance in *Escherichia coli* Isolated from Retail Raw Chicken Meat in Taif, Saudi Arabia. *Foodborne pathogens and disease* (2010) 7:3. doi: 10.1089=fpd.2009.0365

Alves B, Abrantes SMP. Avaliação das bebidas não alcoólicas e não gaseificadas, em relação ao uso de corantes artificiais. *Higiene Alimentar*, (2003) 28:3:534-539.

Amancio AM, Reis LdeO, Pereira JBB, Lucia M, Malaquias LCC, Chavasco JK. Estudo da ação antimicrobiana de extratos de plantas do gênero *Psidium*. *Revista de Universidade Vale do Rio Verde*, (2015) 13:644-652.

Bagetti M. Caracterização físico-química e capacidade antioxidante de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) (2009). [Dissertação]. [Santa Maria (RS)]: Universidade Federal de Santa Maria.

Bajpai VK, Shama A, Baek K. Antibacterial mode of action of *Cudrania tricuspidata* fruit essential oil, affecting membrane permeability and surface characteristics of food-borne pathogens. *Food Control* (2013) 32:582–590.

Bakkalif F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils-a review. *Food and Chemical Toxicology* (2008) 46:446-475.

Bassolé IHN, Juliani HR. Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties. *Molecules* (2012) 17:3989-4006. doi:10.3390/molecules17043989

Birgelmeyer R, Andrade JMM, Aboy AL, Apel MA, Dresch RR, Marin R, et al. Comparative Analysis of the Chemical Composition and Antioxidant Activity of Red (*Psidium cattleianum*) and Yellow (*Psidium cattleianum* var. *lucidum*) Strawberry Guava Fruit. *Journal of Food Science* (2011) 76:7. doi: 10.1111/j.1750-3841.2011.02319.x

Bona EAMde, Pinto FGda S, Fruet TK, Jorge CM, Moura ACde. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos, *Arquivo do Instituto Biológico* (2014) 81:3. doi: 10.1590/1808-1657001192012

Burt S. Essential oils : their antibacterial properties and potential applications in foods — a review. *International Journal of Food Microbiology* (2004) 94:223–253.

Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira (2010) 2:546p.

Calo JR, Crandall PG, O'Bryan CA, Ricke SC. Essential Oils as Antimicrobials in Food Systems – A Review. *Food Control* (2015) 54:111–119.

Celli , GB. (2011) Comportamento fisiológico e bioquímico de frutos da pitangueira (*Eugenia uniflora* L.): características de interesse para o consumo humano. [Dissertação]. [Curitiba (PR)]: Universidade Federal do Paraná.

CLSI, *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Ninth Edition*. CLSI document M07-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, (2012), USA.

CLSI, M02-A12: Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Twelfth Edition. *CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)* (2015a) 35:1.

CLSI, M07-A10: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Tenth Edition. *CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)* (2015b) 35:2.

Cushnie TP, Lamb AJ. Detection of galangin-induced cytoplasmic membrane damage in *Staphylococcus aureus* by measuring potassium loss. *Journal of Ethnopharmacology* (2005) 101: 243–248.

DannenberGdaS, Funck GD, Mattei FJ, Silva WPda, Fiorentini ÂM. Antimicrobial and antioxidant activity of essential oil from pink pepper tree (*Schinus terebinthifolius* Raddi) in vitro and in cheese experimentally contaminated with *Listeria monocytogenes*. *Food Science and Emerging Technologies* (2016) 36:120–127.

Desoti VC, Maldaner CL, Carletto MS, Heinz AA, Coelho MS, Piati D, et al. Triagem fitoquímica e avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica de plantas medicinais nativas da região oeste do estado do Paraná. *Arquivos de Ciência da Saúde de UNIPAR*, (2011) 15:3-13.

Diao W, Hu Q, Zhang H, Xu J. Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). Food Control (2014) 35:109–116.

Faleiro ML. The mode of antibacterial action of essential oils. In: MENDEZ-VILAZ, Antonio. (Org.). Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. Badajoz: Formatex Research Center, (2011), 1143-1156.

Franzon, RC. (2004) Caracterização de mirtáceas nativas do Sul do Brasil. [Dissertação]. [Pelotas (RS)]: Universidade Federal de Pelotas.

Forsythe SJ. Microbiologia da Segurança Alimentar. Porto Alegre: Artmed (2013).

Garófalo A, Avesani CM, Camargo KG et al. Dieta e câncer: um enfoque epidemiológico. Revista de Nutrição, (2014), 17:4:491-505.

Issa ZM; Mustakim M, MOHAMED SAS, MUDA NM, YEN LH, RADU, S. Antibigram Profiles of *Listeria monocytogenes* isolated from foods. In: 2nd International Conference on Biotechnology and Food Science (2014) 7: 133-137, IACSIT Press, Singapore.

Gershenzon J, Dudareva N. The function of terpene natural products in the natural world. Nature Chemical Biology (2007) 3:7:408-414.
doi:10.1038/nchembio.2007.5

Gutierrez J, Barry-Ryan C, Bourke P. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components. Food Microbiology, (2009) 26:142-150.

Lago JHG, Souza ED, Mariane B, Pascon R, Vallim MA, Martins RCC, et al. "Chemical and biological evaluation of essential oils from two species of myrtaceae - *Eugenia uniflora* L. and *Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel,". Molecules (2011) 16:12.
doi:10.3390/molecules16129827.

Lima VLAG, Mélo EA, Lima DES. Fenólicos e carotenóides totais em Pitanga. Scientia Agrícola (2002) 59:3. doi. 10.1590/S0103-90162002000300006

Lira Júnior JS, Bezerra JEF, Lederman IE, Silva Júnior JFda. Pitangueira. Recife: Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária-IPA (2007) 87p.

Macwan SR, Dabhi BK, Aparnathi KD, Prajapati JB. Essential Oils of Herbs and Spices: Their Antimicrobial Activity and Application in Preservation of Food. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* (2016) 5:5. doi: 10.20546/ijcmas.2016.505.092

Massarioli AP, Oldoni TLC, Moreno IAM, Rocha AA, Alencar SM. Antioxidant activity of different pitanga (*Eugenia uniflora* L.) fruit fractions. *Journal of Food Agriculture and Environment* (2013) 11:1:288-293.

Medina AL, Hass LIR, Chaves FC, Salvador M, Zambiasi RC, Silva WPda, et al. Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. *Food Chemistry* (2011) 128:916–922. doi:10.1016/j.foodchem.2011.03.119

Moura APBL, Acioli R, Duarte DAM, Pinheiro Júnior JW, Alcântara JS, Mota RA. Caracterização e perfil de sensibilidade de *Staphylococcus* spp. isolados de amostras de carne caprina comercializadas em mercados e supermercados em Recife, PE. *Arquivos do Instituto Biológico* (2016) 73: 1: 7-15.

Karwowski, MSM (2012) Estudo da estabilidade, comportamento reológico e dos compostos fenólicos de frutas da Mata Atlântica. [Dissertação]. [Curitiba (PR)]: Universidade Federal do Paraná.

Keszei A, Brubaker CL, Carter R, Kollner T, Degenherdt J, Foley WJ. Functional and evolutionary relationships between terpene synthases from Australian Myrtaceae. *Phytochemistry* (2010) 71:844–852. doi: 10.1016/j.phytochem.2010.03.013

Polônio MLT, Peres F. Consumo de aditivos alimentares e efeitos à saúde: desafios para a saúde pública brasileira. In: *Cad. Saúde Pública* (2009) 25:8:1653-1666.

Proteggente AR, Pannala AS, Paganga G, Van Buren L, Wagner E, Wiseman S, et al. The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. *Free Radical Research* (2002) 36:2:217 – 233.

Rai M, Paralikar P, Jogge P, Agarkert G, Ingle AP, Derita M, Zacchino S. Synergistic antimicrobial potential of essential oils in combination with nanoparticles : Emerging trends and future perspectives. *International Journal*

of Pharmaceutics (2017) 519:1–2: 67–78.

Resende ALS, Mattos IE, Koifman S. Dieta e câncer gástrico: aspectos históricos associados ao padrão de consumo alimentar no estado do Pará. *Revista de Nutrição*, (2006) 19:4:511- 519.

Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim CSF, Melo LFC. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova* (2004) 27:5. doi: 10.1590/S0100-40422004000500017

Robards K, Prenzler PD, Tucker G, Swatsitang P, Glover W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry* (1999) 66:4. doi:10.1016/S0308-8146(99)00093-X

Rocha WS, Lopes RM, Silva DBda, Vieira RF, Silva JPda, Agostini-Costa TdaS. Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. *Revista Brasileira de Fruticultura* (2011) 33:4:1215-1221

Rodrigues AdaF, Amorim LV, Oliveira JMGde, Dias CN, Morais DFC, Andrade EHdeA, et al. *Eugenia uniflora* L. Essential Oil as a Potential Anti-Leishmania Agent: Effects on *Leishmania amazonensis* and Possible Mechanisms of Action Klinger. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* (2013) 2013:1-10. doi: 10.1155/2013/279726

Rutz, JK. (2016) Microencapsulação de carotenoide: caracterização, estabilidade e aplicação em sistemas alimentícios. [Tese de Doutorado]. [Pelotas (RS)]: Universidade Federal de Pelotas.

Sánchez DV, Cabo MCL, Ibusquiza OS, Herrera JJR. Incidence and characterization of *Staphylococcus aureus* in fishery products marketed in Galicia (Northwest Spain). *International Journal of Food Microbiology* (2012) 157: 286-296.

Santi Ilde, Gatto DA, Machado MRG, Santos PSBdos, Freitag RA. Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activity of the Oil and Plant Extract *Myrocarpus frondosus* Allemão. *American Journal of Plant Sciences* (2017) 8:1560-1571. doi: 10.4236/ajps.2017.87108

Santos CAF, Castro JMC, Souza FF, Vilarinho AA, Ferreira FR, Pádua JG, et al. Preliminary characterization of *Psidium* germplasm in different Brazilian ecogeographic regions. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* (2008) 43:3:437-440.

Scaglioni PT, Souza TDde, Schmidt CG, Furlong EB. Availability of free and bound phenolic compounds in rice after hydrothermal treatment. *Journal of Cereal Science* (2014) 60:3. doi.org/10.1016/j.jcs.2014.08.005

Schmidt V, Cardoso MRdel. Sobrevivência e perfil de resistência a antimicrobianos de *Salmonella* spp. isoladas em um sistema de tratamento de dejetos de suínos. *Ciência Rural* (2003) 33:5:881-888.

Scur MC, Pinto FGS, Pandini JA, Costa WF, Leite CW, Temponi LG. Antimicrobial and antioxidant activity of essential oil and different plant extracts of *Psidium cattleianum* Sabine. *Brazilian Journal of Biology* (2016) 76:1. doi:10.1590/1519-6984.13714

Silva NCC, Barbosa L, Seito LN, Fernandes Junior A. Antimicrobial activity and phytochemical analysis of crude extracts and essential oils from medicinal plants. *Natural Product Research* (2012) 26:16. doi: 10.1080/14786419.2011.564582

Simonetti, E. (2015) Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de *Eugenia anomala* e *Psidium salutare* (myrtaceae) frente à *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*. [Dissertação]. [Lajeado (RS)]: Centro Universitário UNIVATES.

Sobral-Souza CE, Leite NF, Cunha FAB, Pinho AI, Costa JGM, Coutinho DM. Avaliação da atividade antioxidante e citoprotetora dos extratos de *Eugenia uniflora* Lineau e *Psidium sobleianum* Proença & Landrum contra metais pesados. *Revista Ciências de La Salud* (2014) 12:3. doi: dx.doi.org/10.12804/revsalud12.03.2014.08

Soliman FM, Fathy MM, Salama MM, Saber FR. Comparative study of the volatile oil content and antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. and *Psidium cattleianum* Sabine leaves. *Bulletin of Faculty of Pharmacy* (2016) 219-225. doi: 10.1016/j.bfopcu.2016.06.003

Souza SP, Cardoso MG, Souza PE, Guimarães LGL, Andrade J, Mallet ACT, et al. Óleo essencial de *Baccharis tridentata* Vahl: composição química, atividade antioxidante, e fungitóxica e caracterização morfológica das estruturas secretoras

por microscopia eletrônica de varredura. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais (2011) 13:4. doi: 10.1590/S1516-05722011000400011

Sun J, Chu Y, Wu X, Liu R. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. Journal of Agricultural and Food Chemistry (2002) 50:25:7449 –7454.

Teixeira, AM. Estudo fitoquímica de genótipos de araçá (*Psidium cattleianum*) em seis safras (2008 to 2013). [Tese de Doutorado]. [Pelotas (RS)]: Universidade Federal de Pelotas.

Victoria FN, Lenardão EJ, Savegnago L, Perin G, Jacob RG, Alves D, et al. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: Antioxidant and antimicrobial properties. Food and Chemical Toxicology (2012) 50:2668–2674. doi: 10.1016/j.fct.2012.05.002

WHO (World Health Organization) (2015). WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015.

WHO (World Health Organization) (2017). Food safety.

Ziech RE, Perin AP, Sereno MJ, Sfaciotte RAP, Viana C, Bersot LdosS. Sensibilidade a Antimicrobianos e Produção de ESBL por *Salmonella* spp. Isoladas de Salas de Cortes de Plantas Processadoras de Aves do Oeste Paranaense. In: Anais do 12º Congresso Latinoamericano de Microbiologia e Higiene de Alimentos - MICROAL 2014 [= Blucher Food Science Proceedings, num.1, vol.1] (2014) São Paulo: Editora Blucher.

8. Considerações finais

Os extratos metanólicos e os óleos essenciais de *P. cattleianum* S. e *E. uniflora* L. apresentaram atividade antibacteriana. O extrato de *P. cattleianum* S. obteve melhor ação quando comparado ao OE da mesma planta. Já o óleo essencial de *E. uniflora* L. apresentou CIM menores, em relação ao extrato, sendo assim, obtiveram atividade superior. *E. coli* O157:H7 NCTC 12900 foi a bactéria mais sensível, pois obteve a menor CIM de $6,4 \text{ mg.mL}^{-1}$ quando testado com OE de *E. uniflora* L.. Os óleos essenciais apresentaram na sua composição química beta-cariofileno e elixeno, respectivamente, ambos da classe dos terpenos. Os extratos de *P. cattleianum* S. obtiveram $7,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ e *E. uniflora* L. $1,72 \text{ mg.mL}^{-1}$ quando determinado os compostos fenólicos totais. Ao analisar os ácidos fenólicos presentes em cada um dos extratos foi encontrado como majoritários o ácido gálico para *E. uniflora* L. e o ácido cafeico para *P. cattleianum* S..

O óleo essencial de *E. uniflora* L. foi o mais eficaz para inibir o crescimento de bactérias de importância alimentar, pois podemos concluir que a concentração de 54 mg.mL^{-1} deste OE seria a menor concentração suficiente para inibir todas as bactérias testadas e 270 mg.mL^{-1} para eliminá-las. No entanto, estudos adicionais para verificar a toxicidade e identificar compostos ativos são necessários, para que se possa compreender o mecanismo de ação dos extratos e óleos testados.

Referências

- ADAM, F.; VAHIRUA-LECHAT, I.; DESLANDES, E.; MENUT, C. Aromatic plants of French Polynesia. V. Chemical composition of essential oils of leaves of *Psidium guajava* L. and *Psidium cattleianum* Sabine. **Journal of Essential Oil Research**, v. 23, p. 98-101, 2011.
- ALEJANDRA, V.; DOMINGUEZ, G. G.; MARLANA, H. B. Fatores de virulência de *Listeria monocytogenes* e sua regulação. **Revista Chilena Infectologia**, v. 30, n. 4, p. 407 - 416, 2013.
- ALLERBERGER, F.; WAGNER, M. Listeriosis: a resurgent foodborne infection. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, p. 16 – 23, 2010.
- ALTALHI, A. D.; GHERBAWY, Y. A.; HASSAN, S. A. Antibiotic Resistance in *Escherichia coli* Isolated from Retail Raw Chicken Meat in Taif, Saudi Arabia. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.7, n.3, 2010.
- ALVES, B.; ABRANTES, S. M. P. Avaliação das bebidas não alcoólicas e não gaseificadas, em relação ao uso de corantes artificiais. **Higiene Alimentar**, v.28, n.3, p.534-539, 2003.
- AMANI, J.; AHMADPOUR, A.; IMANI FOOLADI, A. A.; NAZARIAN, S. Detection of *E. coli* O157:H7 and *Shigella dysenteriae* toxins in clinical samples by PCR – ELISA. **Brazilian Journal of Infectious Disease**, v. 19, p. 278 – 284, 2015.
- AMANCIO, A. M.; REIS, L. de O.; PEREIRA, J. B. B.; LUCIA, M.; MALAQUIAS, L. C. C.; CHAVASCO, J. K. Estudo da ação antimicrobiana de extratos de plantas do gênero *Psidium*. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 13, n1, p. 644-652, 2015.
- ANGELO, P. M.; JORGE, J. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 232-240, 2007.
- AURICCHIO, M. T.; BACCHI, E. M. Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga): Revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. v. 62, n. 1, p. 55-61, 2003.

BAGETTI, Milena. **Caracterização físico-química e capacidade antioxidante de pitanga (*Eugenia uniflora* L.)**. 2009. 84 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

BAJPAI, V. K.; SHAMA, A.; BAEK, K.. Antibacterial mode of action of *Cudrania tricuspidata* fruit essential oil, affecting membrane permeability and surface characteristics of food-borne pathogens. **Food Control**, v. 32, p. 582–590, 2013.

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

BASSOLÉ, I. H. N.; JULIANI, H. R. Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties. **Molecules**, v. 17, p. 3989-4006, 2012.

BEZERRA, N. A.; FELISMINO, D. DE C.; CHAVES, T. P.; ALENCAR, L. C. B.; DANTAS, I. C.; SOBRINHA, L. C. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Eugenia uniflora* L. **Revista Biologia e Farmácia**. v. 8, n. 2, p. 40-48, 2012.

BIEGELMEYER, R.; ANDRADE, J. M. M.; ABOY, A. L.; APEL, M. A.; DRESCH, R. R.; MARIN, R.; RASEIRA, M. do C. B.; HENRIQUES, A. T. Comparative Analysis of the Chemical Composition and Antioxidant Activity of Red (*Psidium cattleianum*) and Yellow (*Psidium cattleianum* var. *lucidum*) Strawberry Guava Fruit. **Journal of Food Science**, v. 76, n.7, 20, p. 991-996, 2011.

BONA, E. A. M. de; PINTO, F. G. da SILVA; FRUET, T. K.; JORGE, C. M.; MOURA, A. C. de. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 81, n. 3, p. 218-225, 2014.

BOURGAUD, F.; GRAVOT, A.; MILESI, S.; GONTIER, E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science**, v.161, p.839-851, 2001.

BUCHANAN, A. Foodborne disease significance of *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *E. coli*. **Food Technology**, v. 51, p. 69 – 76, 1997.

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

253, 2004.

BRASIL, Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria. **Farmacopeia Brasileira**, v. 2, p. 546, 2010.

BRUN, G. R.; MOSSI, A. J. Caracterização química e atividade antimicrobiana do óleo volátil de pitanga (*Eugenia uniflora* L.). **Perspectiva**. Erechim, vol. 34, n. 127, p. 135-142, 2010.

CALO, J. R.; CRANDALL, P. G.; O'BRYAN, C. A.; RICKE, S. C. Essential Oils as Antimicrobials in Food Systems – A Review. **Food Control**, v. 54, p. 111–119, 2015.

CAMPOS, F. M.; COUTO, J. A.; FIGUEIREDO, A. R.; TÓTH, I. V.; RANGEL, A. O. S. S.; HOGG, T. A. Cell membrane damage induced by phenolic acids on wine lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.135, p. 144–151, 2009.

CELLI, Giovana Bonat. **Comportamento fisiológico e bioquímico de frutos da pitangueira (*Eugenia uniflora* L.): características de interesse para o consumo humano**. 2011. 148 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention), 2017. **Preventing Food Poisoning**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/foodsafety/prevention.html>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

CHITARRA, M. A. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2.ed. rev. e ampl. Lavras: UFLA, 2005. 785p.

CLSI, *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Ninth Edition*. CLSI document M07-A9. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA, 2012.

CLSI, M02-A12: Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Twelfth Edition. *CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)*, v. 35, n. 1, 2015a.

CLSI, M07-A10: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Tenth Edition. *CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)*, v. 35, n. 2, 2015b.

CORADIN, L.; SIMINSKI, A.; REIS, A.. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro – Região sul.** Brasília: MMA, p. 934, 2011.

CORREAL, J. D. C.; MARQUES, E. A.; GUILHERME, W. L.; LEÃO, R. S.; DAMASCO, P. V. Infecções por *Staphylococcus aureus*: mudança do perfil epidemiológico no Hospital Universitário Pedro Ernesto. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 3, p. 31-46, 2013.

CUSHNIE, T.P.; LAMB, A. J. Detection of galangin-induced cytoplasmic membrane damage in *Staphylococcus aureus* by measuring potassium loss. **Journal of Ethnopharmacology**, v.101, p. 243–248, 2005.

DANNENBERG, Guilherme da Silva. Óleo essencial de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi): atividade antimicrobiana e aplicação como componente ativo em filme para bioconservação de alimentos. 2017. 121f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

DANNENBERG, G. da S.; FUNCK, G. D.; CRUXEN, C. E. dos S.; MARQUES, J. de L.; SILVA, W. P. da; FIORENTINI, Â. M. Essential oil from pink pepper as an antimicrobial component in cellulose acetate film: potential for application as active packaging for sliced cheese. **LWT - Food Science and Technology**, v. 81, p. 314–318, 2017.

DANNENBERG, G. da S.; FUNCK, G. D.; MATTEI, F. J.; SILVA, W. P. da; FIORENTINI, Â. M. Antimicrobial and antioxidant activity of essential oil from pink pepper tree (*Schinus terebinthifolius* Raddi) in vitro and in cheese experimentally contaminated with *Listeria monocytogenes*. **Food Science and Emerging Technologies**, v. 36, p. 120–127, 2016.

DESOTI, V. C.; MALDANER, C. L.; CARLETTO, M. S.; HEINZ, A. A.; COELHO, M. S.; PIATI, D.; TIUMAN, T. S. Triagem fitoquímica e avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica de plantas medicinais nativas da região oeste do estado do Paraná. **Arquivos de Ciência da Saúde** de UNIPAR, Umuarama, v. 15, n. 1, p. 3-13, jan./abr. 2011.

DIAO, W.; HU, Q.; ZHANG, H.; XU, J.. Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). **Food Control**, v. 35, p. 109–116, 2014.

DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. Construindo a história dos produtos naturais. **MultiCiência**. v. 7, p. 16, 2006.

EFSA, European Centre for Disease Prevention and Control. **The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in the European Union in 2008**. EFSA Journal, v. 8, n. 1, p. 1496, 2010. Acessado em 16 jul. 2016. Online. Disponível em: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/EU-summary-report-trendssources-of-zoonoses-zoonotic-agents-food-borne-outbreaks-in-2008.pdf>.

EMERY, F. da S.; SANTOS, G. B. dos; BIANCHI, R. de C. **A química na natureza**. Coleção Química no Cotidiano, vol. 1. Rio de Janeiro: Cabeça de Papel Projetos e Design LTDA, 2011. 70p.

FALEIRO, Maria L. The mode of antibacterial action of essential oils. In: MENDEZ-VILAZ, Antonio. (Org.). **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**. Badajoz: Formatex Research Center, 2011. p. 1143-1156.

FALEIRO, J. H.; GONÇALVES, R. C.; SANTOS, M. N. G. dos; SILVA, D. P. da; NAVES, P. L. F.; MALAFAIA, G.. The Chemical Featuring, Toxicity, and Antimicrobial Activity of *Psidium cattleianum* (Myrtaceae) Leaves. **New Journal of Science**, v. 2016, p. 1-8, 2016.

FALKEMBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. Introdução à Análise Fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª Ed. Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 2007. 1102 p.

FARIAS, L. A.; FÁVARO, D. I. T. Vinte anos de química verde: conquistas e desafios. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 1089-1093, 2011.

FERNANDES, M. R. V.; DIAS, A. L. T.; CARVALHO, R. R.; SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P. Antioxidant and antimicrobial activities of *Psidium guajava* L. spray dried extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 60, p. 39-44, 2014.

FILHO, S.; PEREIRA, A. P. S.; BAYMA, J. C. Aleloquímico produzido pela gramínea forrageira *Brachiaria humidicola*. **Planta Daninha**, Londrina, v. 23, n. 1, p. 25-32, 2005.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. 2. ed. Porto Alegre, Artmed, 2013.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008.

FRANZON, R.C. **Caracterização de mirtáceas nativas do Sul do Brasil**. Pelotas, 2004. 114p. Dissertação (Mestrado em Fruticultura de Clima Temperado) - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2004.

GARÓFOLO, A. AVESANI, C. M; CAMARGO, K. G et al. Dieta e câncer: um enfoque epidemiológico. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 4, p. 491-505. 2004.

GRIMONT, Patrick A. D.; WEILL, François-Xavier. **Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars**: World Health Organization collaborating centre for reference and research on *Salmonella*. Paris: Institute Pasteur, 2007. 167 p.

GERSHENZON, J.; DUDAREVA, N. The function of terpene natural products in the natural world. **Nature Chemical Biology**, v.3, n. 7, p. 408-414, 2007.

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

ISSA, Z. M.; MUSTAKIM, M.; MOHAMED, S. A. S.; MUDA, N. M.; YEN, L. H.; RADU, S. Antibioqram Profiles of *Listeria monocytogenes* isolated from foods. **In: 2nd**

International Conference on Biotechnology and Food Science. v. 7, p. 133-137, IACSIT Press, Singapore, 2014.

ISSENHUTH-JEANJEAN, S.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; GUIBOURDENCHE, M.; de PINNA, E.; NAIR, S.; FIELDS, P. I.; WEILL, F. X. Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, v. 165, p. 526 – 530, 2014.

KARWOWSKI, Marília Silva Malvezzi. **Estudo da estabilidade, comportamento reológico e dos compostos fenólicos de frutas da Mata Atlântica**. 2012. 89 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

KAVOOSI, G.; ROWSHAN, V. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil obtained from *Ferula assa-foetida* oleo-gum-resin: Effect of collection time. **Food Chemistry**, n. 138, p. 2180-2187, 2013.

KESZEI, A.; BRUBAKER, C. L.; CARTER, R.; KOLLNER, T.; DEGENHARDT, J.; FOLEY, W. J. Functional and evolutionary relationships between terpene synthases from Australian Myrtaceae. **Phytochemistry**, v. 71, p. 844–852, 2010.

KING, A. R.D.; YOUNG, G. E.de D. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **Journal of American Dietetic Association**, v.99, n.2, p.213-218, 1999.

KTSOYAN, Z.; GHAZARYAN, K.; MANUKYAN, G.; MARTIROSYAN, A.; MNATSAKANYAN, A.; ARAKELOVA, K.; GEVORGYAN, Z.; SEDRAKYAN, A.; ASOYAN, A.; BOYAJYAN, A.; AMINOV, R. Inflammatory Responses to *Salmonella* Infections Are Serotype-Specific. **International Journal of Bacteriology**, v. 2013, p. 1 – 7, 2013.

LAGO, J. H. G.; SOUZA, E. D.; MARIANE, B.; PASCON, R.; VALLIM, M. A.; MARTINS, R. C. C.; BAROLI, A. A.; CARVALHO, B. A.; SOARES, M. G.; SANTOS, R. T. dos; SARTORELLI, P. “Chemical and biological evaluation of essential oils from two species of myrtaceae - *Eugenia uniflora* L. and *Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel.”. **Molecules**, v. 16, n. 12, p. 9826–9837, 2011.

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

LIMA, V. L. A. G.; MÉLO, E. A.; LIMA, D. E. S. Fenólicos e carotenóides totais em Pitanga. **Scientia Agricola**, vol. 59, n. 3, p. 447-450, 2002.

LIRA JÚNIOR, J. S.; BEZERRA, J. E. F.; LEDERMAN, I. E.; SILVA JÚNIOR, J. F. da. **Pitangueira**. Recife: Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária-IPA, p. 87, 2007.

LISBOA, G. N.; KINUPP, V. F.; BARROS, I. B. I. *Psidium cattleianum*. In: CORADIN, L.; SIMINSKI, A.; REIS, A. **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro – Região Sul**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2011.

LORENZI, H.; BACHER, L.; LACERDA, M.; SARTORI, S. Frutas brasileiras e exóticas cultivadas (de consumo in natura). São Paulo: **Instituto Plantarum de Estudos da Flora**, p. 672, 2006.

MACWAN, S. R.; DABHI, B. K.; APARNATHI, K. D.; PRAJAPATI, J. B. Essential Oils of Herbs and Spices: Their Antimicrobial Activity and Application in Preservation of Food. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 5, n. 5, p. 885–901, 2016.

MASSARIOLI, A. P.; OLDONI, T. L. C.; MORENO, I. A. M.; ROCHA, A. A.; ALENCAR, S. M. Antioxidant activity of different pitanga (*Eugenia uniflora* L.) fruit fractions. **Journal of Food Agriculture and Environment**. vol. 11, n. 1, p. 288-293, 2013.

MEDINA, A. L.; HASS, L. I. R.; CHAVES, F. C.; SALVADOR, M.; ZAMBIAZI, R. C.; SILVA, W. P. da; NORA, L.; ROMBALDI, C. V. Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. **Food Chemistry**. v.128, p. 916–922, 2011.

MOURA, A.P.B.L.; ACIOLI, R.; DUARTE, D.A.M.; PINHEIRO JÚNIOR, J.W.; ALCÂNTARA, J.S.; MOTA, R.A. Caracterização e perfil de sensibilidade de *Staphylococcus* spp. isolados de amostras de carne caprina comercializadas em mercados e supermercados em Recife, PE. **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 73, n. 1, p.7-15, 2016.

NEGI, P. S. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. **International Journal of Food Microbiology**, v. 156, p. 7-17, 2012.

POLÔNIO, M. L.T.; PERES, F. Consumo de aditivos alimentares e efeitos à saúde: desafios para a saúde pública brasileira. In: **Cad. Saúde Pública**. v.25, n.8, p. 1653-1666, 2009.

PROTEGGENTE, A. R.; PANNALA, A. S.; PAGANGA, G.; VAN BUREN, L.; WAGNER, E.; WISEMAN, S.; PUT, F. V. de; DACOMBE, C. The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. **Free Radical Research**. v.36, n.2, p. 217 – 233, 2002.

RAI, M.; PARALIKAR, P.; JOGGE, P.; AGARKERT, G.; INGLE, A. P.; DERITA, M.; ZACCHINO, S. Synergistic antimicrobial potential of essential oils in combination with nanoparticles : Emerging trends and future perspectives. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 519, n. 1–2, p. 67–78, 2017.

RASEIRA, M. C. B.; ANTUNES, L. E. C.; TREVISAN, R.; GONÇALVES, E. D. **Espécies frutíferas nativas do sul do Brasil**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, p. 122, 2004.

RESENDE, A. L. S.; MATTOS, I. E; KOIFMAN, S. Dieta e câncer gástrico: aspectos históricos associados ao padrão de consumo alimentar no estado do Pará. **Revista de Nutrição**, v.19, 4, p. 511- 519, 2006.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, C. S. F.; MELO, L. F. C.. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, S. D. **Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) frente a bactérias isoladas de alimentos: Estudos invitro e em matriz alimentícia**. 103f. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Federal da Bahia, 2011.

ROBARDS, K.; PRENZLER, P. D.; TUCKER, G.; SWATSITANG, P.; GLOVER, W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. **Food Chemistry**, v. 66, p. 401-436, 1999.

ROCHA, W. S.; LOPES, R. M.; SILVA, D. B. da; VIEIRA, R. F.; SILVA, J. P. da; AGOSTINI-COSTA, T. da S. **Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado**. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal - SP, v. 33, n. 4, p. 1215-1221, 2011.

RODRIGUES, A. da F.; AMORIM, L. V.; OLIVEIRA, J. M. G. de; DIAS, C. N.; MORAIS, D. F. C.; ANDRADE, E. H. de A.; MAIA, J. G. S.; CARNEIRO, S. M. P.; CARVALHO, F. A. de A. *Eugenia uniflora* L. Essential Oil as a Potential Anti-Leishmania Agent: Effects on *Leishmania amazonensis* and Possible Mechanisms of Action Klinger. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2013, p. 1-10, 2013.

RUTZ, Josiane Kuhn. **Microencapsulação de carotenoides: caracterização, estabilidade e aplicação em sistemas alimentícios**. 2016. 116f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

SÁNCHEZ, D. V.; CABO, M.CL.; IBUSQUIZA, P. S.; HERRERA, J. J.R. Incidence and characterization of *Staphylococcus aureus* in fishery products marketed in Galicia (Northwest Spain). **International Journal of Food Microbiology**. v. 157, p. 286-296, 2012.

SANTI, I. I. de; GATTO, D. A.; MACHADO, M. R. G.; SANTOS, P. S. B. dos; FREITAG, R. A. Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activity of the Oil and Plant Extract *Myrocarpus frondosus* Allemão. **American Journal of Plant Sciences**, v. 8, p. 1560-1571, 2017.

SANTOS, M. S. **Caracterização físico-química e aproveitamento tecnológico do *Psidium cattleianum* Sabine (Araçá-vermelho)**. 2006. 177f. Dissertação de Mestrado (Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2006.

SANTOS, C. A. F.; CASTRO, J. M. C.; SOUZA, F. F.; VILARINHO, A. A.; FERREIRA, F. R.; PÁDUA, J. G.; BORGES, R. M. E.; BARBIERI, R. L.; SOUZA, A. G. C.; RODRIGUES, M. A. Preliminary characterization of *Psidium* germplasm in diferente Brazilian ecogeographic regions. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v.43, n.3, p. 437-440, 2008.

SANTOS, S. F.; NOVALES, M. G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current in Opinion Biotechnology**, n. 23, p.136–141, 2012.

SANTURIO, F. D. **Uso de óleos essenciais de especiarias para controle de coliformes em lingüiça toscana**. 2015, 62f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2015.

SAVOIA, D. Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. **Future Microbiology**, v. 7, p. 979-990, 2012.

SCAGLIONI, P. T.; SOUZA, T. D. de; SCHMIDT, C. G.; FURLONG, E. B. Availability of free and bound phenolic compounds in rice after hydrothermal treatment. **Journal of Cereal Science**, v. 60, n. 3, p. 526-532, 2014.

SCHMIDT, V.; CARDOSO, M.R. de I. Sobrevivência e perfil de resistência a antimicrobianos de *Salmonella* spp. isoladas em um sistema de tratamento de dejetos de suínos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.33, n.5, p.881-888, set/out. 2003.

SCUR, M. C.; PINTO, F. G. S.; PANDINI, J. A.; COSTA, W. F.; LEITE, C. W.; TEMPONI, L. G. Antimicrobial and antioxidant activity of essential oil and different plant extracts of *Psidium cattleianum* Sabine. **Brazilian Journal of Biology**, v. 76, n. 1, p. 101-108, 2016.

SILVA, N. C. C.; BARBOSA, L.; SEITO, L. N.; FERNANDES JUNIOR, A.. Antimicrobial activity and phytochemical analysis of crude extracts and essential oils from medicinal plants. **Natural Product Research**, v. 26, n. 16, p. 1510–1514, 2012.

SIMONETTI, Eveline. **Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de *Eugenia anomala* e *Psidium salutare* (myrtaceae) frente à *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*** 2015. 100 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro Universitário UNIVATES, Lajeado, 2015.

SIRIWOHARN, T.; WROLSTAD, R. E.; FINN, C. E.; PERERIRA, C. B. Influence of cultivar, maturity, and sampling on Blackberry (*Rubus* L. Hybrids) anthocyanins, polyphenolics, and antioxidant properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.8021-8030, 2004.

SOBRAL-SOUZA, C. E.; LEITE, N. F. CUNHA, F. A. B.; PINHO, A. I.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, D. M.. Avaliação da atividade antioxidante e citoprotetora dos extratos de *Eugenia uniflora* Lineau e *Psidium sobleianum* Proença & landrum contra metais pesados. **Revista Ciencias de la Salud**, v.12, n.3, p.401-409, 2014.

SOLIMAN, F. M.; FATHY, M. M.; SALAMA, M. M.; SABER, F. R. Comparative study of the volatile oil content and antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. and *Psidium cattleianum* Sabine leaves.

Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University, v. 54, n. 2, p. 219-225, 2016.

SOUZA, S. P.; CARDOSO, M. G.; SOUZA, P. E.; GUIMARÃES, L. G. L.; ANDRADE, J. MALLET, A. C. T.; NELSON, D. L. Óleo essencial de *Baccharis tridentata* Vahl: composição química, atividade antioxidante e fungitóxica, e caracterização morfológica das estruturas secretoras por microscopia eletrônica de varredura.

Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu, v.13, n.4, p.456-466, 2011.

SOUZA, E.L.; LIMA, E.O.; NARAIN, N. Especiarias: uma alternativa para o controle da qualidade sanitária e de vida útil de alimentos, frente às novas perspectivas da indústria alimentícia. **Higiene Alimentar**, v.17, n.113, p. 38-42, 2003.

SUN, J.; CHU, Y.; WU, X.; LIU, R. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n. 25, p. 7449 – 7454, 2002.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4. ed. Porto Alegre. Ed. Artmed, 2006. 719p.

TAUXE, R. V.; DOYLE, M. P.; KUCHENMULLER, T.; SCHLUNDT, J.; STEIN, C. E. Evolving public health approaches to the global challenge of foodborne infections. **International Journal of Food Microbiology**, v.139, p. 16–28, 2010.

TEIXEIRA, Andréa. Miranda. **Estudo fitoquímico de genótipos de araçá (*Psidium cattleianum*) em seis safras (2008 a 2013)**. 2015. 85f. Tese (Doutorado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

TRABULSI, L. R.; ALTHERTHUM, F. **Microbiologia**. *Staphylococcus aureus*. São Paulo: Atheneu, 2005.

VANIN, C. R. **Araçá Amarelo: Atividade antioxidante, composição nutricional e aplicação em barra de cereais**. 2015, 117f. Dissertação (Curso de Mestrado

Profissionalizante em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Campus Francisco Beltrão, Londrina-PR.

VARNAM, A. H. **Foodborne pathogens**. St. Louis: Mosby Year Book. p. 557, 1991.

VERPOORTE, R.; MEMELINK, J. Engineering secondary metabolite production in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v.13, p.181-187, 2002.

VICTORIA, F. N.; LENARDÃO, E. J.; SAVEGNAGO, L.; PERIN, G.; JACOB, R. G.; ALVES, D.; SILVA, W. P. da; MOTTA, A. de S. da; NASCENTE, P. da S. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: Antioxidant and antimicrobial properties. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 2668–2674, 2012.

WHO (World Health Organization), 2015. **WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015**. Disponível em:
<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/199350/1/9789241565165_eng.pdf>
Acesso em: 12 ago. 2016.

WHO (World Health Organization), 2017. **Food safety**. Disponível em:
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/en/> Acesso em: 13 jan. 2018.

ZIECH, R. E.; PERIN, A. P.; SERENO, M. J.; SFACIOTTE, R. A. P.; VIANA, C.; BERSOT, L. dos S. Sensibilidade a Antimicrobianos e Produção de ESBL por *Salmonella* spp. Isoladas de Salas de Cortes de Plantas Processadoras de Aves do Oeste Paranaense. In: **Anais do 12º Congresso Latinoamericano de Microbiologia e Higiene de Alimentos - MICROAL 2014** [= BlucherFood Science Proceedings, num.1, vol.1]. São Paulo: Editora Blucher, 2014