

**EFEITO ANTIBACTERIANO *IN VITRO* DE  
EXTRATOS VEGETAIS SOBRE BACTÉRIAS  
PATOGENICAS**

**ANA LÚCIA ALVARENGA**

**2004**

10

10

59240

050401

**ANA LÚCIA ALVARENGA**

**EFEITO ANTIBACTERIANO *IN VITRO* DE EXTRATOS VEGETAIS  
SOBRE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação Em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de “Mestre”.

**Orientadora**

Profa. Dra. Rosane Freitas Schwan

**LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2004**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Alvarenga, Ana Lúcia

Efeito antibacteriano *in vitro* de extratos vegetais sobre bactérias  
patogênicas / Ana Lúcia Alvarenga. -- Lavras : UFLA, 2005.

63 p. : il.

Orientador: Rosane Freitas Schwan.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Extrato etanólico. 2. Extrato aquoso. 3. Planta medicinal. 4. Atividade  
antimicrobiana. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-581.634  
-664.5

**ANA LÚCIA ALVARENGA**

**EFEITO ANTIBACTERIANO *IN VITRO* DE EXTRATOS VEGETAIS  
SOBRE BACTÉRIAS PATOGENICAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação Em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 06 de dezembro de 2004.

Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli - UFLA

Profa. Dra. Kátia Regina F. Schwan-Estrada - UEM



Profa. Dra. Rosane Freitas Schwan - UFLA  
(Orientadora)

**LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me permitido existir e poder cumprir minha missão. Por também permitir que este caminho da minha vida fosse repleto de oportunidades de crescimento pessoal, realização de sonhos. Por me permitir ser, viver, sentir, perceber e saber que nada é por acaso. Pelos dons concedidos e por Sua iluminação e bênção, pois através destas é que muitas vezes tive forças para superar os meus próprios limites. Quando ninguém podia me socorrer eu adormecia e me entregava em seus braços.

Aos anjos que nos protegem e nos mostram caminhos mais assertivos e estão também sempre de braços abertos para nos acolher. Foi esta a família que Deus escolheu para eu nascer. Agradeço ao meu Pai, minha Mãe, meus familiares mais próximos, João Marcos, José Antônio, Darlene, Pedro Paulo, Alice, Vovó Nadir, Tios e Primos, e à irmã de coração Aline.

À professora Rosane Freitas Schwan, pela oportunidade de realização do mestrado. Agradeço as orientações, os incentivos, a dedicação, a amizade e os ensinamentos recebidos.

Aos professores Disney, Kátia e José Eduardo Brasil, pelas orientações e sugestões.

À professora Gracita, que muito me animou a fazer este mestrado.

À professora Roberta H. Picolli, pelas sugestões, empréstimo e doação de materiais para o experimento e pelo incentivo e amizade.

À Claudia Eugênia, pela valiosíssima ajuda durante o início do experimento.

À laboratorista Ivani, que sempre muito me ajudou e me ensinou. Agradeço a amizade, o incentivo e o carinho com o qual me auxiliou. Que Deus a abençoe.

À laboratorista do Departamento de Ciência dos Alimentos, Eliana de Mara Alcântara, pelos ensinamentos e ajuda durante o experimento.

Aos colegas do curso, Euziclei, Valdirene, Márcio, Victor e Helson Mário, obrigada pela ajuda e amizade.

Também não poderia esquecer da Cidinha, muito prestativa e muito amiga.

À Magda, que muito me ajudou com as fotografias. Obrigada, você foi sempre muito gentil.

À Nazaré, funcionária do Departamento de Entomologia, por ter gentilmente emprestado os materiais.

À amizade, o carinho e cooperação dos alunos, tanto de graduação como de pós-graduação, dos Departamentos de Biologia e de Ciência dos Alimentos.

A todos que foram meus professores, obrigada pelos seus ensinamentos e amizade.

Às amigas Aline, Nilziene e Vanessa, pela constante ajuda.

Ao meu irmão João Marcos, pelo constante incentivo e ajuda durante o curso.

Ao meu sobrinho Pedro Paulo. Obrigada pelas fotos.

Aos colegas Viviane, Renata, Val e Victor, pela ajuda e pela amizade.

À Jocione e à Didi, pela ajuda na digitação.

Aos alunos de doutorado, Alessandra e Cláudio, pela ajuda constante.

À UFLA, pela oportunidade.

Aos professores e funcionários dos Departamentos de Biologia e Ciência dos Alimentos, pelo auxílio constante.

À Fundação André Toselho, pela doação de cepas ATCC, na pessoa da Joseane.

Ao professor Disney, ao Vilmar e Maurício, pelo fornecimento das plantas.

Aos meus pacientes, por terem compreendido, muitas vezes, a minha ausência.

A todos aqueles que, no anonimato, contribuíram de maneira direta ou indireta na realização deste trabalho.



## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
RESUMO .....	i
ABSTRACT .....	ii
1 INTRODUÇÃO .....	01
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	03
2.1 Considerações gerais .....	03
2.2 Princípios ativos de plantas medicinais .....	04
2.3 Resistência bacteriana a antimicrobianos .....	10
2.4 Propriedade antimicrobiana das plantas .....	12
2.5 Algumas plantas aromáticas com efeito antimicrobiano .....	15
2.5.1 <i>Rosmarinus officinallis</i> .....	15
2.5.2 <i>Mentha piperita</i> .....	15
2.5.3 <i>Zingiber officinallis</i> .....	17
2.5.4 <i>Origanum vulgare</i> .....	17
2.5.5 <i>Salvia officinallis</i> .....	18
2.5.6 <i>Cymbopogon citrates</i> Stapf .....	19
2.6 Patógenos de importância em alimentos e saúde pública .....	20
2.6.1 <i>Staphylococcus aureus</i> enterotoxigênico .....	20
2.6.2 <i>Salmonella</i> .....	22
2.6.3 <i>Listeria</i> .....	24
2.6.4 <i>Shigella</i> .....	25
2.6.5 <i>Streptococcus</i> .....	26
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	29
3.1 Microrganismos testados .....	29
3.2 Preparo dos inóculos .....	29
3.3 Preparo dos extratos fitoterápicos .....	29
3.4 Semeadura dos microrganismos .....	31
3.5 Avaliação do efeito dos extratos no crescimento de microrganismos patogênicos .....	31
3.5.1 Preparação das suspensões microbianas .....	31
3.5.2 Avaliação da atividade bactericida dos extratos .....	32
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	34
5 CONCLUSÕES .....	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	46
ANEXOS .....	59

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
FIGURA 1	Ciclo biossintético dos metabólitos secundários ..... 05
FIGURA 2	Formação de halos intermediários sobre <i>Shigella flexneri</i> utilizando extratos alcoólicos a 20% de plantas medicinais aromáticas ..... 39

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
TABELA 1 Patógenos que apresentam aumento da frequência de isolamento das linhagens resistentes .....	11
TABELA 2 Espécies de plantas e partes usadas para extração dos extratos .....	30
TABELA 3 Média dos diâmetros, em mm, dos halos de inibição da ação antimicrobiana. Extratos vegetais aquosos .....	34
TABELA 4 Média dos diâmetros, em mm, dos halos de inibição da ação antimicrobiana. Extratos vegetais aquosos .....	35
TABELA 5 Média dos diâmetros, em mm, dos halos de inibição da ação antimicrobiana. Extratos vegetais aquosos .....	35
TABELA 6 Média dos diâmetros, em mm, dos halos de inibição da ação antimicrobiana. Extratos vegetais alcoólicos .....	36
TABELA 7 Média dos diâmetros, em mm, dos halos de inibição da ação antimicrobiana. Extratos vegetais alcoólicos .....	36
TABELA 8 Média dos diâmetros, em mm, dos halos de inibição da ação antimicrobiana. Extratos vegetais alcoólicos .....	37

## RESUMO

ALVARENGA, Ana Lúcia. **Efeito antibacteriano *in vitro* de extratos vegetais sobre bactérias patogênicas.** 2004. 63p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.<sup>1</sup>

As bactérias patogênicas, de grande importância em saúde pública, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri* e *Salmonella choleraesuis* podem estar veiculadas a alimentos, comprometendo seriamente a sua qualidade e, dependendo da quantidade presente e da condição de saúde dos pacientes, poderá levá-los à morte. Portanto torna-se necessário à utilização de métodos seguros e eficientes no controle destas bacterioses. Assim, neste trabalho utilizaram-se extratos aquosos e etanólicos de *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Cymbopogon citratus* (capim limão), *Zingiber officinallis* (gengibre), *Mentha piperita* (hortelã), *Origanum vulgare* (orégano) e *Salvia officinalis* (sálvia) nas concentrações de 10% e 20% sobre seis cepas das bactérias patogênicas: *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans* e *Salmonella choleraesuis*. Na avaliação da atividade antimicrobiana através do método de difusão em Ágar Müller Hinton, as cepas foram espalhadas na superfície do meio de cultura e colocados cilindros de metal com 100 µL de cada um dos extratos. Como controle negativo utilizou-se água destilada ou álcool a 70%; para o controle positivo foram utilizados antibióticos específicos para cada cepa bacteriana. Os resultados mostraram que o extrato etanólico de sálvia a 20% foi o mais eficiente no controle de *Listeria monocytogenes*. Todos os extratos etanólicos a 20% foram eficientes para o controle de *Shigella flexneri*. Para *Streptococcus mitis*, o extrato etanólico de gengibre a 20% apresentou a maior atividade antibacteriana.

**Palavras-chave:** extrato etanólico, extrato aquoso, plantas condimentares medicinais; atividade antimicrobiana.

---

<sup>1</sup> Comitê orientador: Rosane Freitas Schwan - UFLA (Orientadora); Disney Ribeiro Dias - UEMG (Co-orientador).

## ABSTRACT

ALVARENGA, A. L. *In vitro* antibacterial effect of vegetable extracts on pathogenic bacteria. 2004. 63p. Dissertation (Master in Food Science) - Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.<sup>1</sup>

The pathogenic bacteria, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri* e *Salmonella choleraesuis*, that are of great importance on public health, can be connected to food, and seriously implicating on food's quality and depending of the quantity and the patient's health condition, they can lead them to death. Thus, it is necessary the use of safe and efficient methods to control these bacterial action. The aim of this study was utilize waterish and ethanolic extracts of *Rosmarinus officinalis* (rosemary), *Cymbopogon citratus* (lemon grass), *Zingiber officinallis* (ginger), *Mentha piperita* (mint), *Origanum vulgare* (orégano) and *Salvia officinalis* (salvia) on the concentrations of 10% and 20% over six pathogenic bacteria: *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans* and *Salmonella choleraesuis*. On the evaluation of the antimicrobial activity through diffusion method in Agar Müller Hinton, the strains were spread on the surface of growth solution and placed metal cylinders with 100 µL of each of the extracts. For a negative control it was utilized distilled specific antibiotics for each bacterial stem. The results indicated that the salvia ethanolic extract at 20% was more efficient for controlling *Shigella flexneri*. For *Streptococcus mitis*, the ginger ethanolic extract at 20% presented the higher antibacterial activity.

**Key words:** ethanolic extract, waterish extract, medicinal aromatical plants, antimicrobial activity.

---

<sup>1</sup> Guidance committee: Rosane Freitas Schwan - UFLA (Adviser); Disney Ribeiro Dias - UEMG (Co-adviser).

## 1 INTRODUÇÃO

Apesar da grande diversidade de antimicrobianos que agem sobre os diversos microrganismos patogênicos, muitas pesquisas têm sido realizadas na tentativa de se chegar ao antimicrobiano ideal, ou seja, aquele que apresenta maior espectro de ação, menor toxicidade, menor custo e menor indício de resistência bacteriana. Estudos com patógenos veiculados pela ingestão de alimentos contaminados, como espécies de *Staphylococcus*, *Listeria*, *Shigella*, *Salmonella*, entre outros, têm sido realizados. O controle das espécies de *Streptococcus*, reconhecido como uma das principais bactérias responsáveis pela cárie dentária, adquiridos pelo contato direto entre hospedeiros, de objetos inanimados (chupetas e brinquedos), pela saliva (principal via de transmissão) e a mãe (mais importante fonte de infecção), tem sido realizado como uso de antimicrobianos, como forma preventiva de inibir o crescimento destas espécies de bactérias.

Embora apresentem vias de transmissão, sintomatologia e mecanismos de infecção diferentes, as doenças causadas por microrganismos patogênicos ou responsáveis pela cárie podem ser consideradas grandes problemas de saúde pública.

Tem-se verificado cientificamente o uso popular de plantas para a obtenção dos mais variados efeitos medicamentosos, incluindo sua aplicação como antimicrobianos (Pozetti et al., 1972). O uso de plantas medicinais, muitas delas cultivadas em fundo do quintal, é prática secular baseada no conhecimento popular e transmitida verbalmente, na maior parte das situações. Numa população com baixo acesso a medicamentos, como a brasileira, agregar garantias científicas a essa prática terapêutica traz variadas vantagens. Nesse sentido, a investigação de materiais naturais como fontes de novos agentes antibacterianos

tem aumentado potencialmente nos últimos vinte anos, quando diferentes extratos de plantas medicinais, condimentares e aromáticas têm sido testados.

Assim, o objetivo deste trabalho foi o de avaliar o efeito de extratos de diferentes plantas aromáticas ou medicinais sobre bactérias patogênicas de importância em saúde pública.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Considerações gerais

Nas últimas décadas, a utilização de plantas medicinais como opção de tratamento e cura tem aumentado em todas as classes sociais das mais diversas regiões do mundo. Sabe-se que 80% da população do planeta já fizeram uso de algum tipo de planta, sendo 30% por indicação médica (Castro et al., 2000).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda o uso de fitoterápicos como forma de reduzir os custos dos programas de saúde pública, provendo mais fácil acesso para a população mais pobre, em especial nos países em desenvolvimento e subdesenvolvidos (Matos, 1989).

No Brasil, a flora é extremamente rica, com cerca de 55 mil espécies vegetais catalogadas, das quais 10 mil podem ser consideradas medicinais, aromáticas e úteis (Rodrigues, 1998). Apesar da grande diversidade, nada se sabe sobre a composição química de 99,6% destas plantas. O Brasil ainda importa 84% dos fármacos que é utilizado a custo muito elevado (Simões et al., 2001). É importante ressaltar que grande parte dos compostos secundários já isolados de plantas medicinais, ainda está para ser estudado quanto às suas atividades biológicas (Stangarlin et al., 1999; Cowan, 1999; Simões et al., 2001).

Os vegetais têm uma grande capacidade de sintetizar substâncias que, em muitos casos, são utilizadas como defesa contra microrganismos, insetos e herbívoros (Dempsey et al., 1993), ou na geração de odores, cores e sabor, e que servem de modelo para a síntese de inúmeros fármacos. Entretanto, somente 15% a 17% das plantas foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal (Simões et al., 2001).

As plantas medicinais cientificamente aprovadas para serem utilizadas



pela população nas suas necessidades básicas de saúde têm sido avaliadas quanto à sua eficiência terapêutica e toxicologia. Uma vez classificadas como produtos naturais, é permitido, legalmente, que sejam comercializadas livremente, além de poderem ser cultivadas por pessoas que disponham de condições necessárias. Com isso, a automedicação em casos mais simples, tem reduzido a procura por médicos, o que vem facilitar e reduzir ainda mais o custo do serviço de saúde pública (Martins et al., 1995).

## 2.2 Princípios ativos de plantas medicinais

Os produtos fitoquímicos podem ser divididos em dois grupos: os metabólitos primários ou macromoléculas, presentes em todos os seres vivos e os secundários ou micromoléculas. Os primeiros são os lipídeos, protídeos e glicídios. Destes, por meios de vias biossintéticas, derivam os metabólitos secundários (Figura 1) (Cowan, 1999; Simões et al., 2001; Habermehl, 1998; Simões et al., 2001), com estruturas complexas e atividade biológica importante, muitas vezes restritas somente a determinados grupos vegetais (Habermehl, 1998; Simões et al., 2001). Apresentam diferenças qualitativas e quantitativas entre as diferentes espécies e, apesar de produzidos em pequenas quantidades, os seus efeitos terapêuticos, em contrapartida, são notáveis (Simões et al., 2001). Existem ainda os metabólitos terciários, aqueles produzidos por microrganismos que vivem em simbiose com o vegetal e que são incorporados pela planta, como, por exemplo, as toxinas produzidas pelo fungo *Myrothecium verrucaria*, presentes nas raízes de *Baccharis dracunculifolia*, incidente no sul do Brasil, Uruguai e norte da Argentina, responsáveis pelo envenenamento de gado nestas regiões (Habermehl, 1998).

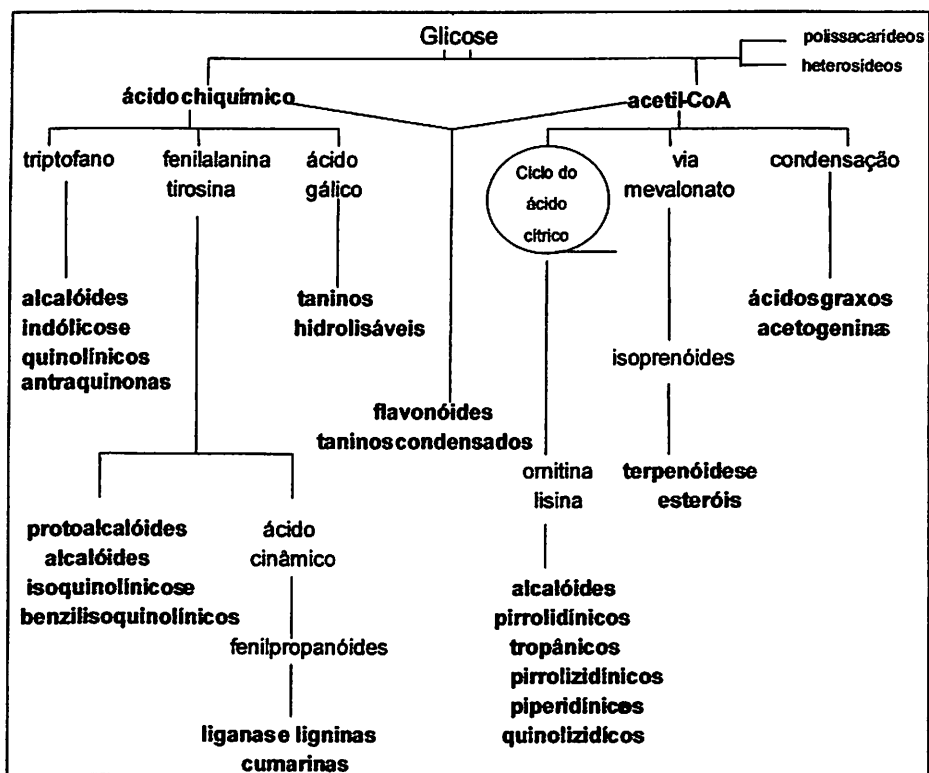


FIGURA 1 Ciclo biossintético dos metabólitos secundários (Simões et al., 2001).

A variedade e a complexidade de metabólitos biossintetizados pelas plantas formaram-se e evoluíram, como mecanismo de defesa desses vegetais às condições ambientais ricas em microrganismos, insetos, animais e também às condições de adaptação e regulação. No contexto da evolução das plantas terrestres, estima-se que cerca de 500.000 espécies ocupem todo o planeta. Dessa forma, as plantas constituem um enorme laboratório de síntese orgânica, fruto de milhões de anos de evolução e adaptação sobre a terra (Reinbothe et al., 1990).

Geralmente, estas substâncias não se encontram na planta em estado

puro, mas sob a forma de complexos, cujos diferentes componentes se completam e reforçam na sua ação sobre o organismo (Simões et al., 2001).

Conforme foi mostrado na Figura 1, existem vários princípios ativos nas plantas medicinais e dentre eles as saponinas. As saponinas caracterizam-se, do ponto de vista químico, por um radical glicídico (glicose, galactose) ligado a um radical aglicono. A sua propriedade física principal é reduzir fortemente a tensão superficial da água. Além disso, as saponinas exibem a propriedade de proporcionarem a hemólise dos glóbulos vermelhos (eritrócitos), isto é, libertam a sua hemoglobina, o que explica o efeito tóxico de algumas delas, tornando-as impróprias para consumo (Simões et al., 2001).

Os princípios amargos são substâncias que apresentam gosto amargo, excitam as células gustativas, estimulam o apetite e aumentam a secreção dos sucos gástricos. A farmacologia agrupa, sob o nome de princípios amargos, as substâncias vegetais terpênicas susceptíveis de libertar azuleno, assim como glicosídeos de diversas estruturas bioquímicas (Simões et al., 2001).

De acordo com Simões et al. (2001), as substâncias amargas, frequentes nas drogas vegetais, podem estar associadas, na planta, a outras substâncias ativas. E neste grupo que se encontram-se, nomeadamente, os glicosídeos fenólicos ou os derivados do fenilpropano, como as cumarinas de perfume característico. Os mesmos autores colocam que um segundo grupo de substâncias aromáticas é constituído pelos produtos de condensação das moléculas de ácido acético ativado (acetogeninas). É a este grupo que pertencem às substâncias fenólicas denominadas flavonóides.

Os taninos, substâncias de composição química variável, são hidrossolúveis. O seu interesse medicinal reside essencialmente na sua natureza adstringente: possuem a propriedade de coagular as albuminas das mucosas e dos tecidos, criando assim uma camada de coagulação isoladora e protetora, cujo efeito é reduzir a irritabilidade e a dor e deter os pequenos derrames de sangue

(Simões et al., 2001).

Os óleos essenciais são líquidos voláteis, refringentes, de odor característico. Estes óleos são formados, em grande número de plantas, como subprodutos do metabolismo secundário. Estes óleos acumulam-se em certos tecidos no seio das células ou de reservatórios de essência, sob a epiderme dos pêlos, das glândulas ou nos espaços intracelulares. Do ponto de vista químico, tratam-se de misturas extremamente complexas (Simões et al., 2001).

Os óleos essenciais compõem-se, sobretudo, de terpenos, produtos voláteis freqüentemente misturados com outras substâncias, definíveis pelo conjunto de propriedades, entre as quais se destacam: cheiro, sabor e elevada concentração (Di Stasi, 1996). Desde a pré-história, nossos antepassados utilizavam essas substâncias com finalidades diversas (Worwood, 1995). Essas substâncias se encontram nas plantas sob a forma de complexos, cujos componentes se completam e reforçam a sua ação sobre o organismo. Worwood (1995) e Davis (1996) citam várias propriedades medicinais atribuídas aos óleos essenciais, sendo as principais: adstringente, analgésico, antidepressivo, antipirético, antiviral, bactericida, bacteriostático, béquico, citofilático, desodorante, estimulante, fungicida, fungistático e imunoestimulante.

Os terpenos são metabólitos secundários derivados do acetato, cuja estrutura básica é o isopreno, e que quando possuem elementos adicionais, como o oxigênio, são denominados terpenóides (Simões et al., 2001). São ativos contra bactérias, fungos e protozoários, agindo possivelmente na desorganização da estrutura da membrana. Alguns terpenos (monoterpenos e sesquiterpenos) são constituintes de óleos essenciais e os pigmentos (flavonóides, antocianinas e betalainas) agem atraindo insetos, pássaros, morcegos e ratos, responsáveis pela polinização (Habermehl, 1998; Cowan, 1999). Os gincolídeos, terpenos presente no *Ginkgo biloba*, por exemplo, são responsáveis pela inibição do fator de ativação plaquetária e os seus flavonóides pela atividade captadora de radicais

livres (Cowan, 1999; Simões et al., 2001).

Os fenóis são compostos derivados de um anel fenólico, sendo que quanto maior for seu grau de hidroxilação, maior sua toxicidade para microrganismos (Simões et al., 2001). Provavelmente, os compostos oxidados inibem a atividade enzimática por reação de grupos sulfidríla ou por interações não específicas com proteínas (Cowan, 1999; Habermehl, 1998).

Além dos fenóis simples, as quinonas, que podem ser consideradas derivadas por oxidação, de compostos aromáticos, são compostos que também podem ser utilizados pelas plantas como antifúngico. Talvez por estarem relacionadas com reações redutoras, assim reagem com histidina, triptofano e tirosina, induzindo reações de oxidação; flavonas e flavonóides produzidos em resposta a infecções microbianas; flavonóis e taninos responsáveis pela preservação do fruto até o total desenvolvimento da semente e cumarinas dão sabor amargo (Cowan, 1999). As atividades antimutagênica e antitumoral do chá preto (*Camellia sinensis*) são atribuídas a compostos fenólicos presentes na mesma, assim como o efeito antioxidante do mate (Habermehl, 1998; Cowan, 1999).

Os glicosídeos, produtos do metabolismo secundário das plantas, compõem-se em duas partes. Uma contém açúcar, por exemplo, a glicose, e é geralmente inativa, embora favoreça a solubilidade do glicosídeo, a sua absorção e mesmo o seu transporte para determinado órgão. O efeito terapêutico é determinado pela segunda parte, a mais ativa, designada aglicono (Simões et al., 2001).

Os alcalóides são compostos nitrogenados complexos, de natureza básica, capaz de produzir geralmente poderosos efeitos fisiológicos. São, na maior parte dos casos, venenos vegetais muito ativos, dotados de ação específica (Simões et al., 2001). A ação antimicrobiana deste grupo, em especial contra protozoários, está relacionada à sua capacidade de se intercalar ao DNA. Além

disso, esses compostos, nos vegetais, dão sabor amargo, porém, a sua propriedade mais marcante é a neurotoxicidade (Habermehl, 1998; Cowan, 1999).

Os peptídeos que apresentam atividade inibitória sobre microrganismos, pertencem ao grupo de moléculas positivamente carregadas e portadoras de pontes disulfeto. Sua ação está, provavelmente, relacionada à formação de canais iônicos na membrana celular ou à inibição por competição da aderência das proteínas microbianas aos receptores polissacarídeos do hospedeiro. Essas proteínas são codificadas pelos genes de resistência (genes R) (Hammond-Kosak & Jones, 1997; Cowan, 1999).

As grandes moléculas de lecitinas apresentam forte atividade antiviral, sendo seu provável mecanismo de ação a inibição da interação do vírus com componentes celulares do hospedeiro (Cowan, 1999).

Além dessas classes, outras substâncias de origem vegetal mostram atividade antimicrobiana, como poliaminas, isotiocianatos e tiosulfatos, fazendo esta última parte do grupo de substâncias que contêm enxofre, derivadas de aminoácidos (Cowan, 1999). A aliina, substância contida no alho, pela ação da alinase origina a alicina, que é responsável pelas atividades biológicas (anti-hipertensiva, hipocolesterolemiantes, inibidora de agregação plaquetária, fibrinolítica, antidiabética) e odor característico do alho (Simões et al., 2001). Este produto, cuja atividade antibacteriana foi relatada por Pasteur no século XIX, tem sido muito utilizado como fármaco desde a Antiguidade. Sua ação é creditada à reatividade da alicina e seus produtos de degradação frente a grupos sulfidrilas de proteínas (Cowan, 1999; Simões et al., 2001).

Entretanto, Santos et al. (1999) citam que quando certos extratos vegetais são analisados com o fim de se encontrar qual dos seus componentes é responsável pela sua atividade antimicrobiana, encontra-se não um, mas um conjunto de compostos que somente são bioativos quando juntos. Os autores

citam como exemplo dessa mistura complexa o látex de *Carica papaya*, que é constituído de papaína, carpaína e terpenóides, e apresenta atividade bacteriostática sobre *Bacillus subtilis*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* e *Proteus vulgaris* e a própolis que apresenta composição química muito complexa, com a presença de terpenóides, flavonóides, ácidos benzóicos e ácidos fenólicos substituídos. Estima-se que a própolis composta por cerca de 150 derivados, dos quais apenas dois têm origem puramente animal (Santos et al., 1999).

A própolis, *in vitro*, apresenta atividade antiviral, antibacteriana e antifúngica. Entretanto, quando seus compostos são isolados, estes apresentam atividade muito menor do que a do extrato, levando a crer que seus componentes atuam sinergisticamente (Cowan, 1999).

### **2.3 Resistência bacteriana a antimicrobianos**

Apesar das grandes descobertas relacionadas com o efeito de extratos de plantas sobre microrganismos, um dos maiores problemas de saúde pública enfrentados nas últimas décadas foi o aumento da resistência a antimicrobianos de populações bacterianas (Okeke et al., 1999). Atualmente, registra-se aumento substancial na freqüência do isolamento de bactérias que eram reconhecidamente sensíveis às drogas usadas rotineiramente, mas que se apresentam agora resistentes a todos ou quase todos fármacos disponíveis no mercado, como ocorre com várias bactérias multirresistentes (Tabela 1) (Huycke et al., 1998).

Muitas linhagens multirresistentes de *Staphylococcus aureus*, por exemplo, reconhecido patógeno associado à infecção hospitalar ou adquirida na comunidade, já são sensíveis apenas ao tratamento com vancomicina, mostrando-se resistentes aos aminoglicosídeos,  $\beta$ -lactâmicos, macrolídeos,

tetraciclinas, quinolonas e outros quimioterápicos (Chartone-Souza, 1998).

TABELA 1 Patógenos que apresentam aumento da frequência de isolamento de linhagens resistentes.

Patógeno	Drogas	País (Ano)
<i>Campylobacter</i> <sup>1</sup>	Fluoroquinolonas	Tailândia (1981-1995)
<i>E. coli</i> enterotoxigênica <sup>1</sup>	Cotrimetoxazol	Tailândia (1981-1995)
<i>Enterococcus faecium</i> <sup>4</sup>	Vancomicina	França (1986) EUA (1989)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> <sup>1</sup>	Isoniazida, estreptomicina, rifampicina Sulfonamidas,	Quênia (1981-1990) Marrocos (1992-1994)
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> <sup>3</sup>	penicilinas, tetraciclina	Mundial (década de 90)
<i>Neisseria meningitidis</i> <sup>2</sup>	Penicilina	Europa (desde 1995)
<i>Salmonella</i> (não tifóide) <sup>1</sup>	Cotrimetoxazol Ampicilina, cloranfenicol, cotrimetoxazol	Tailândia (1981-1995) Bangladesh (1989-1993)
<i>Salmonella typhi</i> <sup>1</sup>	Ampicilina, tetraciclina, sulfonamidas, ácido nalidíxico	Bangladesh (1983-1990) Brasil (1988-1993) Ruanda (1988-1993) Tailândia (1981-1995)
<i>Staphylococcus aureus</i> <sup>5</sup>	Penicilina, ampicilina, meticilina (MRSA) vancomicina (VISA)	EUA (1960; 1980); Japão (1996) EUA (1997)
<i>Streptococcus pneumoniae</i> <sup>2</sup>	Penicilina, cefotaxime, ceftriaxome, macrolídeos	Austrália e Nova Guiné (década de 60) África do Sul (1977) Europa e EUA (desde 1991)
<i>Vibrio cholerae</i> <sup>1</sup>	Cotrimetoxazol, ampicilina, ácido nalidíxico	Guiné-Bissau (1987-1995) Índia (1993-1995)

Continua ...



TABELA 1 Continuação ...

Patógeno	Drogas	País (Ano)
<i>Yersinia pestis</i> <sup>3</sup>	Ampicilina, cloranfe-nicol, estreptomicina, espectinomicina, cana-micina, tetraciclina, sulfonamidas	Madagascar (1997)

<sup>1</sup> Okeke et al. (1999).

Recentemente, entretanto, foram isoladas linhagens mutantes com sensibilidade reduzida a vancomicina (Domin, 1998). Esses dados antecipam os gravíssimos problemas que essas linhagens multirresistentes poderão trazer, caso não surjam novos antimicrobianos ou terapias alternativas para combatê-los (Labischinski et al., 1998).

A relevância da resistência a drogas e a exploração de recursos fitoterápicos, são demonstradas pelos incentivos dados por agências internacionais, tal qual a OMS e nacionais, como o Ministério da Saúde e pelo Ministério da Educação (Moreira et al., 1997).

#### 2.4 Propriedade antimicrobiana das plantas

O uso de componentes de plantas para propósitos farmacêuticos tem gradualmente aumentado no Brasil. Segundo Santos et al. (1995), a OMS tem preconizado que as plantas medicinais são as melhores fontes para a obtenção de grande variedade de medicamentos.

Cerca de 80% da população mundial utiliza a medicina tradicional com compostos derivados de plantas medicinais e comumente 20% tem acesso aos medicamentos químicos. Entretanto, tais propriedades têm sido investigadas

para o seu melhor entendimento quanto à segurança e eficiência (Ellof, 1998).

Muitas plantas têm sido utilizadas pelas características antimicrobianas, que devem-se a compostos sintetizados no metabolismo secundário das mesmas. Estes produtos são conhecidos por suas substâncias ativas, por exemplo, os compostos fenólicos, que são parte dos óleos essenciais (Jansen et al., 1987), assim como os taninos (Saxena et al., 1994).

As propriedades antimicrobianas têm sido investigadas por grande número de pesquisadores do mundo todo, especialmente na América Latina. Na Argentina, uma pesquisa testou 122 espécies de plantas usadas em tratamentos terapêuticos (Anesini & Perez, 1993). Foi documentado que, entre os compostos extraídos destas plantas, vinte inibiram o crescimento de *Staphylococcus aureus*, dez inibiram *Escherichia coli* e quatro inibiram *Aspergillus niger*. Foi também relatado que o composto mais eficaz foi extraído de *Tabebuia impetiginosa* (ipê-roxo).

Martinez et al. (1994) e Martinez et al. (1996) detectaram as propriedades antimicrobianas obtidas de *Parthenum argentatum*, conhecida popularmente como guaiule, contra *Candida albicans*, *Torulopsis*, *Hansenula*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Muitos estudos têm sido conduzidos no Brasil. A atividade inibitória de *Vatairea macrocarpa* (angelim) sobre *Klebsiella* spp. e *Staphylococcus aureus* foi observada por Matos et al. (1988) e a atividade inibitória de extratos *Eucalyptus* spp. sobre fungos do solo por Bruna et al. (1989). Bravo-Martins (2004) verificou o efeito inibitório de extratos de *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Ocimum gratissimum* (alfavaca), *Cymbopogon citratus* (capim-limão), *Tropaeolum majus* (capuchinha), *Mentha piperita* (hortelã) e *Salvia officinalis* (sálvia) no crescimento de diferentes espécies de leveduras isoladas de silagem de cana-de-açúcar.

Estudo mais detalhado sobre compostos antimicrobianos avaliou extratos

de 120 espécies de plantas de 28 famílias diferentes (Santos et al., 1990). Foi observado que 81 extratos obtidos de 58 plantas foram ativos contra *S. aureus* e cinco extraídos de outras quatro plantas inibiram o crescimento de *P. aeruginosa*. Extratos de *Lippia gracilis* (erva cidreira) e *Xylopia sericea* (pindaíba-vermelha) mostraram atividade antifúngica. A investigação da atividade antimicrobiana, bem como a toxicidade de extratos de 30 espécies de plantas contra cinco bactérias e dois fungos, de espécies diferentes, foi também realizada por Nascimento et al. (1990). Neste estudo, concluiu-se que extratos etanólicos de 70% das plantas foram tóxicos para a célula e somente a espécie *Combretum duarteanum* (vaqueta) mostrou atividade antimicrobiana.

A atividade antimicrobiana de *Mikania triangularis* (guaco) foi testada contra cinco gêneros de bactérias e três gêneros de leveduras, mostrando alta atividade contra *Bacillus cereus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *S. epidermidis* (Cruz et al., 1996).

As investigações sobre a atividade antimicrobiana dos óleos de vegetais podem ser observadas em grande variedade de organismos incluindo: organismos deterioradores de alimentos (Martins, 2004); organismos contaminantes de alimentos (Lis-Balchin & Deans, 1997); fungos filamentos deterioradores e micotoxigênicos (Knobloch et al., 1989), leveduras patogênicas e dimórficas (Ghannoum, 1988) e vírus (Romerio et al., 1989).

Zaika (1988) relatou que as bactérias gram-positivas são mais resistentes que as gram-negativas às propriedades antibacterianas dos óleos vegetais, o que contrasta com a hipótese proposta por Deans e colaboradores (Deans & Ritchei, 1987; Deans et al., 1995) de que a suscetibilidade bacteriana para os óleos vegetais e a reação de Gram parece ter uma pequena influência sobre a inibição do crescimento.

De acordo com Conner & Beuchat (1984), a ação antimicrobiana dos óleos essenciais pode ser devido a danos de variedade de sistemas enzimáticos

incluindo aqueles envolvidos na produção de energia e síntese de componentes estruturais. Em geral, os estudos sobre o mecanismo de ação dos óleos essenciais têm usado uma metodologia comum, que atenta para ilustrar efeitos deletérios sobre a membrana celular, por exemplo, permeabilidade e força protomotiva (Ultee et al., 1999).

## **2.5 Algumas plantas aromáticas com efeito antimicrobiano**

### **2.5.1 *Rosmarinus officinallis***

*Rosmarinus officinallis* (*Labiatae*), conhecida popularmente como alecrim, é uma planta de verde intenso, com folhas espinhosas e sabor forte. É aromática e suas flores têm propriedades estimulantes. Podem ser encontradas frescas ou desidratadas. É originário da Costa do Mar Mediterrâneo e também conhecido pelo nome de "Rosmarinus" que lembra a denominação latina *ros marinus* (rosa do mar) (Alecrim medicinal, 2004).

Contém óleo essencial rico em carvacrol e timol, seu princípio ativo, flavonóides e quinonas. Esses componentes são responsáveis por sua forte ação antifúngica e antibacteriana, tornando-se possível agente no controle de enfermidades orais (Aguiar et al., 1984).

### **2.5.2 *Mentha piperita***

Menta é o nome comum de aproximadamente 25 espécies perenes do gênero *Mentha*, que se desenvolve melhor em regiões de clima temperado. O nome se refere a algum membro das *Lamiaceae*, freqüentemente chamada pela família das mentas pelo fato dessas plantas serem caracterizadas por suas folhagens aromáticas. As mentas verdadeiras, entretanto, são restritas a

pequenos grupos e por muitos híbridos. Propaga-se por sementes, porém os híbridos de menta são estéreis e podem se propagar por replante de estolhos (Joly, 1983).

Hortelã é o nome latino da *Mentha piperita*. De acordo com a literatura, as propriedades medicinais desta planta estão relacionadas com sua ação adstringente, anti-séptica, antiprurítica, antiespasmódica, antiemética, carminativa, diaforética, analgésica, anticatarral, antimicrobiana e estimulante (Bove, 1996).

A hortelã contém cerca de 1,2% a 1,5% de óleo essencial. Os óleos voláteis contêm 30-70% de mentol livre e ésteres de mentol e mais de 40 outros compostos. Os principais componentes do óleo são: mentol (29%), mentona (20% - 30%), e mentil acetato (3% - 10%). O óleo de grau farmacêutico, produzido por destilação de partes aéreas frescas da planta, é padronizado para conter não menos de que 44% mentol, 15% - 30% de metona, e 5% de ésteres, em adição aos vários terpenóides. Outros compostos encontrados na hortelã são flavonóides (12%), polifenóis polimetizados (19%), carotenos, tocoferois, entre outros (Murray, 1995).

Dados da literatura apontam a atividade antibacteriana, *in vitro*, da hortelã. Seu óleo e seu principal composto, o mentol, têm efeito antibacteriano moderado contra bactérias gram-positivas e gram-negativas (Pattnaik et al., 1997). Extratos de hortelã são bacteriostáticos contra espécies de *Streptococcus* e *Lactobacillus* (Bayoumi, 1992). O mentol é bactericida contra *Staphylococcus pyogenes*, *S. aureus*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, e *Mycobacterium avium* e fungicida para *Candida albicans*, *Aspergillus albus* e fungos dermatóficis (Pattnaik et al., 1997).

### 2.5.3 *Zingiber officinalis*

O gengibre (*Zingiber officinalis*) é uma das mais importantes plantas condimentares da Ásia. Esta espécie é também chamada de gengibre jamaicano e possui rizomas que contêm resina e óleos voláteis (terpineol, linalol, metileugenol e outros), responsáveis pelo aroma característico (Martins et al., 1995).

Extratos de gengibre apresentam efeito antibacteriano contra bactérias gram-positivas e gram-negativas como *Clostridium*, *Listeria*, *Enterococcus*, e espécies de *Staphylococcus*, mas alguns destes efeitos são destruídos pelo aquecimento (por exemplo, cozimento) (Chen et al., 1985). O gengibre é também conhecido por estimular certas funções digestivas (Yamahara et al., 1985) e por diminuir o colesterol (Bhandari et al., 1998).

Em muitos países tropicais, o gengibre tem sido utilizado para preservar alimentos que se deterioram facilmente como frutas e carnes (Ejechi et al., 1998).

### 2.5.4 *Origanum vulgare*

O orégano é uma planta herbácea perene que cresce em touceiras de 25 a 80 cm de altura. Com florescimento do final da primavera ao fim do verão, libera aroma muito característico. Possui vários componentes ativos, como óleo essencial (timol), ácidos polifenólicos (ácido rosmarínico), taninos e flavonóides, fenóis, origaneno, caneacol, terpineno e sais minerais, além de cimoleno, timoleno e carvacoleno (Sena & Venturi, 2002).

Pertence à família Labiatae, a mesma das manjeronas, alecrim, alfavaca, sálvia, melissa, tomilho, menta, alfavaca, manjerição e muitas outras folhas aromáticas. Seu nome científico é *Origanum vulgare* e é conhecida

popularmente como: orégão, orégano; manjerona-baiana, manjerona-rasteira, manjerona-silvestre, orégano silvestre e manjerona-selvagem, no Brasil e como wild marjoram, oregano (inglês), origan (francês), origano (italiano), dost, oregano (alemão), orégano (espanhol), orenga (catalão), aitz belarr, loragiño (basco) e ourego (galego) (Sena & Venturi, 2002).

O óleo essencial apresenta terpenos fenólicos, como o timol (5%) e carvacrol (65-70%), de propriedades anti-infecciosas e que são os elementos comuns a todas as variedades de orégano (Sagpya, 2004).

Seu óleo essencial tem conhecidas propriedades antioxidantes, associadas ao timol e ao carvacrol, além das fungicidas, bactericidas e citotóxicas. Recentemente, foi comprovado que o óleo essencial de orégano inibe o crescimento de microrganismos que se multiplicam com o calor (*Escherichia coli*, *Salmonella* e *Listeria*) de forma eficaz (Sagpya, 2004).

Numerosos estudos baseados nestes modelos de sistema têm revelado a ação bacteriostática e bactericida deste óleo essencial sobre patógenos como *S. aureus*, *S. typhimurium*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* e sobre bactérias deterioradoras como *Brochothrix thermosphacta*, *P. fluorescens*, *Serratia liquefaciens*, *Lactobacillus carvatus*, *L. sake* e fungos (Skandamis & Nychas, 2002). Entretanto, a aplicação limitada deste composto como preservante de alimento pode ser atribuída ao forte “flavor” que afeta negativamente as propriedades organolépticas dos alimentos.

### **2.5.5 *Salvia officinalis***

A sálvia é uma planta semi-arbustiva, que atinge cerca de 80 cm de altura, bastante ramificada. As folhas, de coloração verde acinzentada, aproximam-se das da hortelã, sendo, no entanto, bem mais compridas do que estas. De superfície rugosa, possuem um pecíolo mais ou menos longo que as

une ao caule. As flores da sálvia podem ser violáceas, azuis, róseas ou brancas, surgindo em inflorescência na forma de espiga, nas porções terminais dos ramos. São melíferas e muito procuradas pelas abelhas (Martins et al., 1995).

Dados da literatura mostram que a sálvia também tem sido utilizada para preservar grande número de alimentos, incluindo carnes e queijos (Schwarz & Ternes, 1992).

O óleo essencial da sálvia contém constituintes ativos (terpenos) com atividade antioxidante (Schwarz & Ternes, 1992) que podem destruir uma variedade de bactérias e fungos (Masterova et al., 1996). A atividade bacteriana deve-se à presença de 1,8-cineol (Duke, 1985), além de substâncias antifúngicas (Nakamura et al., 1999).

O óleo essencial de *S. officinalis* L. tem efetivo microbicida contra patógenos como *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella enteritidis*, bem como atividade antifúngica contra *Aspergillus niger* (Moretti et al., 1998). Os principais componentes detectados por Moretti et al. (1998) foram  $\alpha$ -thujona (24,88%), cânfora (16,03%) e 1,8-cineole (9,79%).

#### **2.5.6 *Cymbopogon citratus* Stapf**

O capim-limão, como é conhecido popularmente no Brasil, é uma espécie da família das gramíneas, pertencente ao gênero que abriga 85 espécies (Abegaz & Yohannes, 1983). A planta é uma erva acaule, cespitosa, de folhas longas, aromáticas, estreitas, agudas e ásperas, com nervura central grossa e acanalada (Leal, 1998).

É originário da Índia, sendo cultivado em todos os países da região dos trópicos. Prefere climas quentes e úmidos, com chuvas bem distribuídas e temperatura média elevada. Não resiste a regiões frias sujeitas a geadas. É cultivado a pleno sol, vegetando em qualquer solo, desde que bem drenado e



fértil (Correa Jr. et al., 1994).

O óleo do capim-limão é um dos óleos essenciais mais importantes, possuindo como componente principal o citral, ou uma mistura dos isômeros, geranial e neral, que é utilizado pela indústria farmacêutica para a síntese de iononas e vitamina A (Martins, 2000). Segundo pesquisas do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), a ação larvívica da espécie no combate ao mosquito da dengue é maior do que a dos inseticidas químicos utilizados (Maschio, 1998).

Seu óleo essencial apresenta ação antibacteriana e antifúngica (Carriconde et al., 1996), possuindo atividade germicida contra 22 espécies de microrganismos diferentes (Ming et al., 1999). Suas propriedades fungicidas podem ser aproveitadas na conservação de alimentos estocados (Martins, 2004) e no tratamento de micoses e alergias (fungos são os maiores causadores de alergias de pele e respiratória).

Pesquisa feita com o capim cidreira constatou grande eficácia contra *Aspergillus flavus*, fungo comumente encontrado em alimentos estocados em galpões e responsável pela sua rápida deteriorização. Propriedades antibacterianas no óleo mostram-se muito úteis no tratamento de doenças provocadas por uma série de microrganismos como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Salmonela entérica*, *Aeromonas veronii* e *Pseudomonas aeruginosa*, entre outras. (Martins, 2000).

## **2.6 Patógenos de importância em alimentos e saúde pública**

### **2.6.1 *Staphylococcus aureus* enterotoxigênico**

Segundo Pereira et al. (2000), estafilococos enterotoxigênicos são aqueles, em sua grande maioria, produtores de coagulase e representados por *Staphylococcus aureus*. Adicionalmente, os autores citam que quando presentes

no alimento em número suficiente, sintetizam enterotoxinas que, ao serem ingeridas, após incubação de uma a quatro horas, ocasionam sintomas de gastroenterite.


Quando o crescimento do *S. aureus* é permitido no alimento, este pode produzir toxina e, embora a bactéria seja destruída pela cocção, a toxina produzida é termoestável e não pode ser destruída pelo calor. Estas toxinas são resistentes à fervura por 60 minutos, podendo manter-se ativas até quando submetidas a autoclavação, a 120°C, por 20 minutos. Segundo Pereira et al. (1999), a propriedade de termorresistência constitui ponto crucial para o controle de qualidade dos alimentos, uma vez que a enterotoxina pode persistir no produto final após o processamento, conseqüentemente oferecendo grande perigo de toxinfecção.

O crescimento de cepas enterotoxigênicas de *S. aureus* em cerca de  $10^6$  ou mais células por grama de alimento é geralmente considerado necessário para que haja produção de toxinas em quantidade suficiente para causar intoxicação se o alimento for consumido (Bergdoll, 1990; Park et al., 1994).

De acordo com Park et al. (1994), pequena dose de enterotoxina estafilocócica (SE), cerca de 100 a 200 ng/g, pode produzir sintomas de toxinfecção.

A preocupação com a qualidade dos alimentos não só envolve os riscos de veiculação de doenças, como também as perdas econômicas oriundas das alterações microbianas. A redução da vida útil e a depreciação do produto pelo consumidor geralmente estão associadas à matéria-prima de má procedência e condições de manipulação inadequadas (Bennik et al., 1996).

O leite cru tem sido apontado como veículo de *Staphylococcus aureus* e outras bactérias. Em trabalho realizado por Reyes et al. (2002) foram isoladas bactérias gram-positivas com resíduos de antimicrobianos de leite cru. Os microrganismos encontrados foram *Staphylococcus*, representando 44% dos



microrganismos, *Streptococcus* (19%), *Enterococcus* (17%), *Bacillus* (9%), *Micrococcus* (4%), *Corynebacterium* (4%) e *Lactococcus* (3%).

### 2.6.2 *Salmonella*

O gênero *Salmonella* é composto por mais de 2.700 sorotipos. Animais e aves são apontados como os reservatórios naturais. A maioria se encontra no trato intestinal do homem ou animais, como patógenos ou como comensais. Gênero da família *Enterobacteriaceae* caracteriza-se como bactérias gram negativas, aeróbias e anaeróbias facultativas, de forma bacilar, não formadoras de esporos. As formas móveis possuem flagelos peritríqueos. São capazes de produzir ácido e, às vezes, gás, a partir da fermentação da glicose, mas não fermentam a lactose. Podem ser catalase positiva e oxidase negativa e reduzem nitratos a nitritos (ICMSF, 1998).

Atualmente, nos Estados Unidos, a *Salmonella* pode ser considerada o patógeno mais relatado como causador de doenças de origem alimentar (Donoghue et al., 2004). Inicialmente, as investigações indicaram que, tipicamente, para causar enfermidade nas pessoas adultas, era necessária a ingestão de  $10^6$ - $10^7$  UFC  $g^{-1}$  do produto contaminado. Entretanto, a investigação de alguns surtos, especialmente quando o veículo foi a água ou alimentos gordurosos ou tamponados, foram encontradas doses  $<100/g$  de *Salmonella* (ICMSF, 1998). A diferença na dose infectiva parece estar relacionada com a sobrevivência da bactéria durante o trânsito gastrintestinal e resistência individual. Por outro lado, as células de gordura protegem o microrganismo da ação dos ácidos do estômago (ICMSF, 1998).

Segundo Mossel & Garcia (1983), mesmo que a contaminação inicial dos alimentos seja pequena em termos quantitativos, são as condições como

temperatura, umidade, pH e conteúdo em nutrientes, que irão permitir a multiplicação desse microrganismo e, assim, tornar real o risco de infecção.

A contaminação de alimentos ocorre em vários estágios da cadeia alimentar, desde o cultivo até o processamento ou mesmo até chegar à mesa do consumidor. A poluição do meio ambiente durante o cultivo e as condições higiênicas inadequadas durante o manuseio e processamento aumentam consideravelmente o risco de contaminação por esses patógenos. Muitas vezes, a contaminação ocorre durante as práticas agrícolas de irrigação e ou fertilização do solo. A utilização de águas poluídas, o esterco animal ou os sedimentos de dejetos são citados como as principais fontes deste e de outros patógenos toxigenos nestes produtos (Gagliardi & Karns, 2000).

Medidas preventivas para controle da salmonelose são aconselhadas pelo "Centers for Disease Control and Prevention" (CDC, 2001) como: 1) tratamento de águas para suprimento municipal, 2) melhoramento das condições higiênicas das fazendas, dos abatedouros de aves e animais, e nas operações de colheita, processamento e embalagem de frutos e hortaliças, 3) aperfeiçoamento e educação sanitária de trabalhadores das indústrias de alimentos e fazendas de produção, com base na segurança dos alimentos, 4) procedimento de inspeção e controle em restaurantes, lanchonetes, "fast-food", etc., para prevenir a contaminação cruzada e erros de manuseio de alimentos que podem levar a surtos, 5) ser particularmente cuidadoso com alimentos preparados para crianças, idosos e pessoas imunocomprometidas e 6) observar o tempo e a temperatura de cocção para frango, carne moída, carne assada, ovos e não comer ou beber alimentos contendo ovos crus ou leite sem pasteurizar.

*Salmonella enterica* sorotipo *choleraesuis* (*S. choleraesuis*) usualmente causa infecção sistêmica no homem, que precisa de tratamento antimicrobiano. Este trabalho isolou cepas de *S. choleraesuis* que foram resistentes pra Ceftriaxone e Ciprofloxacina em pacientes com septicemia (Chiu et al., 2004).

Recentemente, Gradel et al. (2004) pesquisaram a ação de soluções desinfetantes, como formaldeído, glutaraldeído, cloro benzalcônico, peróxido de hidrogênio e água com cálcio (também chamada água dura), sobre bactérias normalmente isoladas de galinheiros (*Salmonella enteritidis*, *Salmonella Senftenberg* e *Enterococcus faecalis*), bactérias estas que podem ser consideradas indicador da limpeza destes ambientes.

Outro estudo avaliou as condições microbiológicas de 13 chiqueiros no sul da Austrália. Foi detectada a presença de *Salmonella*, em baixo nível, nos tanques de quatro chiqueiros. Estes conhecimentos adquiridos asseguram condições para a reutilização dos resíduos com segurança (Chinivasagem et al., 2004).

### 2.6.3 *Listeria*

*Listeria* spp. é um cocobacilo gram-positivo, não-esporulado, não-produtor de ácidos, aeróbio e anaeróbio facultativo, de ampla distribuição ambiental, com caráter ubiqüitário, tendo sido isolado de águas superficiais, de esgotos domésticos, águas residuárias de indústrias de laticínios e de abatedouros, de solos, de insetos, de adubo orgânico e em fezes de animais e inclusive de humanos (Nojimoto et al., 1997).

Pode também ser isolada em diversos produtos alimentícios, sejam crus ou após tratamentos térmicos ou químicos (Franco & Landgraf, 1996).

*L. monocytogenes* é patogênica para o homem e diversos animais e sua ampla distribuição ambiental, igual às outras espécies, é favorecida pela sua capacidade de se desenvolver entre 0°C e 44°C e, embora sua faixa ótima seja entre 30°C e 37°C, pode sobreviver em alimentos congelados. Tolerância pH extremos de 5 e 9, baixa atividade da água e concentrações de NaCl de 10% e até superiores. Este conjunto de características faz com que *Listeria* spp. e *L.*

*monocytogenes*, em especial, sejam patógenos emergentes de grande interesse na área de alimentos e explica o destaque que estes microrganismos vêm ocupando nos últimos anos no controle de qualidade na indústria de alimentos, visto as dificuldades de sua eliminação, assim como a possibilidade de causar doença grave no consumidor (Nojimoto et al., 1994).

No Brasil, existem vários registros da presença de *L. monocytogenes* em leite e derivados (van Dender, 1995).

Estudos recentes avaliaram a atividade antimicrobiana de óleos essenciais extraídos de plantas aromáticas (*Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum*, *Thymus vulgaris* e *Zingiber officinale*) sobre *Listeria monocytogenes*, *L. innocua* e *Staphylococcus aureus*. Foi observado que a maioria dos óleos essenciais testados apresentou atividade antibacteriana em diferentes extensões. O efeito antibacteriano foi devido à permeabilização da membrana citoplasmática (Nguefack, 2004).

#### **2.6.4 *Shigella***

As bactérias do gênero *Shigella* se apresentam como bacilos gram-negativos anaeróbicos facultativos, existindo quatro espécies patogênicas (*S. sonnei*, *S. dysenteriae*, *S. flexneri* e *S. boydii*) (Tortora et al., 2002).

Disenterias causadas por *Shigella* constituem importante problema de saúde em países industrializados e em desenvolvimento (Hoeprich et al., 1994). Apesar de a shigelose ser usualmente autolimitada, a antibioticoterapia efetiva nessa enfermidade reduz a duração e a gravidade da disenteria, podendo diminuir os índices de morbidade e mortalidade (Hoeprich et al., 1994).

Na década de 1980, a terapêutica preconizada para o tratamento das shigeloses, era à base de ampicilina; por volta do final daquela década e início dos anos 1990, observou-se aumento significativo de amostras de *S. flexneri*

resistentes a este antimicrobiano (Lima et al., 1995).

Trabalho recente empregando eletroforese identificou clone de *Shigella dysenteriae* tipo 1 associado com disenterias esporádicas na Índia. Este patógeno mostrou-se resistente a antibióticos como tetraciclina, cloranfenicol e ácido nalidíxico, além de reduzida sensibilidade ao ciprofloxacina (Pazhani et al., 2004).

Nimri et al. (2004) detectaram infecções polimicrobianas em crianças com diarreia na área rural da Jordânia. As fezes foram coletadas de 220 pacientes crianças e 100 controles. Os agentes potencialmente isolados de 143 (65%) foram identificados pelos métodos molecular e microbiológico. Infecções causadas por dois ou mais agentes foram detectadas em 50 dos casos, representando 35%. Microrganismos, como *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Giardia* e *Entamoeba histolytica* foram predominantes. Em 77 dos casos (35%), o agente etiológico não pode ser determinado. Os mais significativos fatores de risco observados foram a idade, o nível de educação da mãe e o uso de água não clorada. A alta taxa de infecção de doenças com diarreia é forte indicação de que estes patógenos circulam pela população.

### 2.6.5 *Streptococcus*

Membros do gênero *Streptococcus* são bactérias gram-positivas esféricas que se apresentam caracteristicamente em cadeias. Uma das características utilizadas para sua classificação é a ação que apresentam em ágar-sangue (Tortora et al., 2002).

Uma das problemáticas associadas a algumas espécies de *Streptococcus*, mais especificamente o *S. mutans* e *S. mitis*, estão relacionadas às infecções bacterianas comuns da cavidade oral nos seres humanos, como a cárie dental e a doença periodontal (Loesche, 1986). A placa dental, ou biofilme dental, tem sido

extensivamente estudada por sua relação com estas infecções (Gibbons & van Houte, 1975).

O desenvolvimento do biofilme dental ocorre em duas fases distintas. Durante a primeira fase, proteínas da superfície bacteriana interagem com o hospedeiro ou com produtos bacterianos adsorvidos à superfície dentária. Na segunda fase, um biofilme se forma com bactérias acumuladas pela coagregação com a mesma espécie ou com outras espécies e produção de uma matriz polissacarídica extracelular (Kolenbrander, 2000).

A lesão de cárie é uma manifestação de um processo patológico que ocorre na superfície do dente por meses ou anos. Esta doença é resultado da interação entre bactérias presentes na cavidade oral, as superfícies dentais e constituintes da dieta, especialmente a sacarose (Bowen, 2002).

Em geral, a aquisição de microrganismos pelo corpo humano ocorre pelo contato direto entre um hospedeiro e outro, por objetos inanimados, como chupetas e brinquedos (Madigan et al., 1997). A saliva é a principal via de transmissão de *S. mutans* (Köhler & Bratthall, 1979) e a mãe é considerada a mais importante fonte de infecção para as crianças (Klein, 2003), embora outros estudos tenham sugerido haver outras formas de aquisição (Mattos-Graner, 2001).

*Streptococcus mutans* e o *Streptococcus sobrinus* são os microrganismos mais comumente relacionados a populações humanas (Loesche, 1986). O *S. mutans* é amplamente distribuído não apenas em populações de moderada ou alta incidência de cárie (Beighton et al., 1987) como também em populações que não apresentam ou têm baixo índice de cárie (Carlsson et al. 1985), o que mostra que a simples colonização por estes microrganismos não implica no desenvolvimento da cárie dental (Bratthall, 1992).

Variações nos fatores de virulência de *S. mutans* também podem influenciar o desenvolvimento da cárie dental (Caufield, 1997). Fatores como a



acidogenicidade (capacidade de produção de ácidos), aciduricidade (capacidade de metabolização de substratos em meios ácidos) e a síntese de glucanos insolúveis (GI) a partir da sacarose pela ação de glicosiltransferases (GTF), estão relacionados à capacidade do *S. mutans* em colonizar as superfícies dentais e a indução de cárie (Smith & Taubman, 1997).

Mattos-Graner et al. (2000) demonstraram correlação positiva entre a síntese de glucanos insolúveis e a capacidade de adesão “*in vitro*” em isolados de *S. mutans* de crianças com cárie ativas, sugerindo haver à presença de genótipos mais virulentos em indivíduos que desenvolvem cárie dental.

Gibbons, em 1984, relatou que o potencial cariogênico dos *S. mutans* é principalmente dependente das suas altas propriedades acidogênicas e da habilidade de se acumular nos dentes. O acúmulo desses microrganismos nos dentes deve-se, principalmente, à síntese de glucanos extracelulares a partir de sacarose.

Foi estudada a transmissão de *Streptococcus mutans* num grupo de famílias usando a técnica de reação PCR para detecção *S. mutans* ATCC 10449. Foi utilizada saliva de 8 crianças de 2 a 3 anos de idade e também de pais e mães. Concluiu-se que os pais e as mães podem ter sido fonte para transmissão do *Streptococcus mutans* para as crianças (Ersin et al., 2004). Este estudo avaliou e concluiu uma predominância de *Streptococcus mitis* e *Streptococcus salivarius* na flora bucal, influenciando no alto risco de cáries dentárias destes pacientes, seguidas de tratamento de radioterapia (Tong et al., 2004).

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Microrganismos testados

O experimento foi realizado no Laboratório de Fisiologia de Microrganismos do Departamento de Biologia e no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos da UFPA. Foram utilizadas cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Listeria monocytogenes* (ATCC 33090), *Salmonella choleraesuis* (ATCC 14028), *Shigella flexneri* (ATCC 25931), *Streptococcus mitis* (ATCC 9811) e *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), provenientes da American Type Culture Collection (ATCC), adquiridos na Fundação André Tosello.

### 3.2 Preparo dos inóculos

Para a padronização da técnica e dimensionamento do inóculo, 2 alças de cada cepa bacteriana foram semeadas em 10 mL do meio de cultura líquido Brain Heart Infusion (BHI) e incubadas a 37°C por 24 horas. As suspensões de microrganismos foram ajustadas de acordo com o tubo 2 da escala de MacFarland, expressa em número de bactérias/mL de meio de cultura.

Foram removidos 100 µL de cada uma das suspensões bacterianas experimentais para posterior inoculação nos meios de origem.

### 3.3 Preparo dos extratos fitoterápicos

Para o teste de inibição dos microrganismos testados fez-se uso de extratos aquosos (10% e 20%) e etanólicos (10% e 20%), preparados e

fornecidos pelo Horto Medicinal do Centro Universitário de Lavras (UNILAVRAS), a partir de plantas frescas selecionadas e colhidas na parte da manhã (entre 8 e 10h): orégano (*Origanum vulgare*), hortelã (*Mentha piperita*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*), sálvia (*Salvia officinalis*), gengibre (*Zingiber officinale*) e capim limão (*Cymbopogon citratus*). Os extratos aquosos foram congelados até o momento de serem usados e os alcoólicos ficaram sob agitação por 20 dias e após este período foram utilizados nos experimentos. As partes utilizadas para o preparo dos referidos extratos, de cada uma das plantas, encontram-se na Tabela 2.

TABELA 2 Espécies de plantas e partes usadas para extração dos extratos

<b>Espécies de plantas</b>	<b>Partes usadas</b>
<i>Cymbopogon citratus</i> (capim limão)	folhas
<i>Mentha Piperita</i> (hortelã)	folhas e caules novos
<i>Origanum vulgare</i> (orégano)	folhas e caules novos
<i>Rosmarinus officinalis</i> (alecrim)	folhas e caules novos
<i>Salvia officinalis</i> (sálvia)	folhas
<i>Zingiber officinallis</i> (gengibre)	rizomas

Foram adicionados 40 mL de água destilada a 10 g de cada planta triturada em Hand Blender (JD-1001) Modelo 14A4257. Após serem trituradas, o homogeneizado obtido foi coado em gaze e filtrado em papel de germinação com auxílio de bomba a vácuo e posteriormente em filtro quantitativo JP 42-faixa azul, com poros de 8 µm, da marca Quanty. A solução foi ainda submetida à filtração, utilizando-se filtro millipore 0,45 µm originando a solução aquosa a 20% que foi acondicionada em frascos e guardada sob congelamento. Em seguida foram adicionados 500 mL de água destilada (estéril) a 500 mL da solução, obtendo-se a solução aquosa a 10%. Foram também submetidos à filtração, e à água destilada.

O extrato alcoólico foi preparado no Centro de Pesquisa da UNILAVRAS. Os extratos foram obtidos em etanol/água nas concentrações de 10% e 20%, por agitação durante 20 dias à temperatura ambiente. Após este período, a solução obtida foi filtrada em gaze e conservada em frasco âmbar.

Todas as etapas do experimento foram realizadas em condições assépticas, em câmara de fluxo laminar (VECO, modelo VLFS-12, série FL-6496).

### **3.4 Semeadura dos microrganismos**

*Streptococcus mutans* e *S. mitis* foram transferidos para meio líquido BHI e incubados para reativação e posterior cultivo em ágar mitis salivarius. Foram removidas 4 alçadas de cada microrganismo testado, para posterior inoculação, em aproximadamente 10 mL do meio de cultura líquido BHI, respeitando-se a numeração para identificação das cepas bacterianas. Após a homogeneização dessa mistura, os tubos foram incubados a 37°C, por 24 horas.

As demais bactérias foram transferidas para o meio líquido Trypticase Soy Broth (TSB) para reativação e posteriormente cultivadas em tripticase soy Ágar, como mencionado anteriormente.

### **3.5 Avaliação do efeito dos extratos no crescimento de microrganismos patogênicos**

#### **3.5.1 Preparação das suspensões microbianas**

As suspensões de microrganismos foram previamente ajustadas ao tubo 2 da escala de MacFarland, apresentando aproximadamente  $6 \times 10^8$  bactérias/mL, segundo padrões estabelecidos pelo Nacional Comitê Control Laboratory

Standart (NCCLS, 2000). O crescimento bacteriano foi evidenciado pela constatação macroscópica da turvação deste meio de cultura. Foi feita coloração de gram para todas as cepas bacterianas utilizadas no experimento.

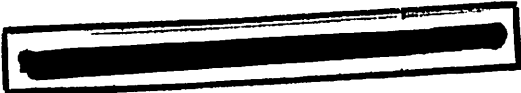
O cultivo das cepas foi realizado em 5 mL de meio de cultura líquido Brain Heart Infusion (BHI, Difco Laboratories, Detroit, Mi, USA), previamente distribuído em tubos de ensaios e esterilizados a 121°C, durante 20 minutos. Para a padronização do inóculo, foram semeadas duas alçadas de cada cepa bacteriana em 5 mL do meio de cultura líquido BHI e incubadas a 37°C por 24 horas. Foi removido 1 mL de cada uma das suspensões experimentais, para posterior utilização, englobando as seis cepas bacterianas. Em todos os casos, as concentrações das suspensões de microrganismos foram ajustadas, com auxílio do mesmo diluente, ao tubo 2 da escala de MacFarland, na concentração aproximada de  $6 \times 10^8$  bactérias/mL.

### **3.5.2 Avaliação da atividade bactericida dos extratos**

Para a realização do trabalho, inicialmente foram preparadas 36 placas de petri com ágar Mueller Hinton, sendo inoculadas na superfície destas, soluções das bactérias utilizadas na pesquisa, com o auxílio de alça de Drigalsky.

Posteriormente, foram perfurados, assepticamente, poços (4x4mm) em pontos equidistantes sobre o ágar, nos quais as soluções bactericidas foram dispensadas.

A atividade bactericida das soluções fitoterápicas foi realizada de acordo com Nakamura et al. (1999). Um volume de 100 µL das suspensões bacterianas envolvidas neste estudo foram inoculadas, em triplicata, em placas contendo Àgar Müeller-Hinton, previamente solidificadas utilizando-se alça de Drigaslky. Após o espalhamento, foram inseridos, assepticamente, oito anéis



(microcilindros de aço) no meio de cultura. Foram colocados seis anéis com os extratos, 1 anel com o solvente (água ou álcool) e um anel com o antibiótico, o qual foi específico para cada cepa de bactéria testada. Nos grupos 1, 2, 3, 4, 5 e 6, as soluções testadas foram formas fitoterápicas elaboradas a partir dos extrato, alcoólico e aquoso, das plantas citadas no item 3.1. No Grupo 7, utilizou-se uma placa padrão controle, sem os cilindros e sem as soluções fitoterápicas; só as cepas de bactérias específicas para cada grupo foram semeadas para que fosse avaliado o crescimento bacteriano. Para o controle negativo no 7º anel, foi colocada água ou etanol conforme o extrato utilizado no grupo de placas. No oitavo anel colocou-se o antibiótico específico para cada bactéria. Vancomicina 500 mg para *Staphylococcus aureus* e ciprofloxacim (250 mg) para *Shigella flexneri* e *Salmonella choleraesuis* e também utilizou-se ampicilina 500 g para *Listeria monocytogenes*. Foi colocada clorexedine para *Streptococcus mutans* e para *Streptococcus mitis*. Os antibióticos utilizados possuem ação bactericida de largo espectro sobre microrganismos gram-positivos e gram-negativos, sendo bastante efetivos contra infecções causadas por estas bactérias (Murray et al., 2004).

Na seqüência, o material foi incubado a 37°C por 24 horas, em ambiente favorável (aerobiose) às exigências respiratórias dos microrganismos indicadores e, então, analisado, macroscopicamente, o tamanho dos halos formados (Ejechi et al., 1999).

Para a interpretação dos resultados foram seguidas as recomendações do NCCLS (2000). Após o período de incubação, os halos de inibição formados foram medidos e comparados com a tabela aprovada internacionalmente pela NCCLS (2000), sendo os microrganismos classificados como resistente (zona de inibição inferior a 15 mm), intermediário (de 15 mm a 29 mm) e sensível (de 30 mm a 35 mm).

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da atividade antimicrobiana dos extratos, aquosos e etanólicos, das plantas condimentares e medicinais contra bactérias testadas estão apresentados nas Tabelas 3, 4, 5, 6, 7 e 8, respectivamente.

TABELA 3 Média dos diâmetros, em mm, dos halos de inibição da ação antimicrobianos. Extratos vegetais aquosos.

Concentração	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Listeria monocytogenes</i>	
	20%	10%	20%	10%
Alecrim	2,00 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>	1,00 <sup>R</sup>	1,83 <sup>R</sup>
Capim-limão	5,17 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>	1,00 <sup>R</sup>
Gengibre	9,17 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>	1,00 <sup>R</sup>	1,83 <sup>R</sup>
Hortelã	8,33 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>	2,33 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>
Orégano	2,00 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>	0,50 <sup>R</sup>	1,17 <sup>R</sup>
Sálvia	7,17 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>	1,33 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>
Água destilada	0,00 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>
Vancomicina	7,83 <sup>R</sup>	6,50 <sup>R</sup>	-	-
Ampicilina	-	-	8,33 <sup>R</sup>	29,50 <sup>I</sup>
Ciprofloxacim	-	-	-	-
Clorexidina	-	-	-	-

<sup>R</sup> Resistente - halo de inibição inferior a 15 mm

<sup>I</sup> Intermediário - halo de inibição de 15 a 29 mm

<sup>S</sup> Sensível - halo de inibição de 30 a 35 mm

TABELA 4 Média dos diâmetros, em mm, dos halos de inibição da ação antimicrobianos. Extratos vegetais aquosos.

Concentração	<i>Salmonella choleraesuis</i>		<i>Shigella flexneri</i>	
	20%	10%	20%	10%
Alecrim	0,00 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>	2,67 <sup>R</sup>	4,33 <sup>R</sup>
Capim-limão	0,00 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>	2,00 <sup>R</sup>	1,83 <sup>R</sup>
Gengibre	0,00 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>	5,17 <sup>R</sup>	2,50 <sup>R</sup>
Hortelã	0,00 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>	5,00 <sup>R</sup>	0,67 <sup>R</sup>
Orégano	0,00 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>	2,33 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>
Sálvia	0,00 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>	2,33 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>
Água destilada	0,00 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>
Vancomicina	-	-	-	-
Ampicilina	-	-	-	-
Ciprofloxacim	43,80 <sup>S</sup>	42,60 <sup>S</sup>	23,00 <sup>I</sup>	18,67 <sup>I</sup>
Clorexidina	-	-	-	-

<sup>R</sup> Resistente - halo de inibição inferior a 15 mm

<sup>I</sup> Intermediário - halo de inibição de 15 a 29 mm

<sup>S</sup> Sensível - halo de inibição de 30 a 35 mm

TABELA 5 Média dos diâmetros, em mm, dos halos de inibição da ação antimicrobianos. Extratos vegetais aquosos.

Concentração	<i>Streptococcus mitis</i>		<i>Streptococcus mutans</i>	
	20%	10%	20%	10%
Alecrim	0,00 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>
Capim-limão	0,00 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>	3,00 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>
Gengibre	0,00 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>	2,67 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>
Hortelã	0,00 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>	2,83 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>
Orégano	0,00 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>	1,17 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>
Sálvia	3,00 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>	1,00 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>
Água destilada	0,00 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>
Vancomicina	-	-	-	-
Ampicilina	-	-	-	-
Ciprofloxacim	-	-	-	-
Clorexidina	13,34 <sup>R</sup>	11,70 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>	14,00 <sup>R</sup>

<sup>R</sup> Resistente - halo de inibição inferior a 15 mm

<sup>I</sup> Intermediário - halo de inibição de 15 a 29 mm

<sup>S</sup> Sensível - halo de inibição de 30 a 35 mm



TABELA 6 Média dos diâmetros, em mm, dos halos de inibição da ação antimicrobianos. Extratos vegetais alcoólicos.

Concentração	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Listeria monocytogenes</i>	
	20%	10%	20%	10%
Alecrim	0,00 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>	6,00 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>
Capim-limão	0,00 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>	0,83 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>
Gengibre	0,00 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>	4,67 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>
Hortelã	0,00 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>	2,83 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>
Orégano	0,00 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>	2,67 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>
Sálvia	0,00 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>	11,17 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>
Etanol	0,00 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>	0,67 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>
Vancomicina	11,00 <sup>R</sup>	7,34 <sup>R</sup>	-	-
Ampicilina	-	-	30,83 <sup>S</sup>	29,33 <sup>I</sup>
Ciprofloxacim	-	-	-	-
Clorexidina	-	-	-	-

<sup>R</sup> Resistente - halo de inibição inferior a 15 mm

<sup>I</sup> Intermediário - halo de inibição de 15 a 29 mm

<sup>S</sup> Sensível - halo de inibição de 30 a 35 mm

TABELA 7 Média dos diâmetros, em mm, dos halos de inibição da ação antimicrobianos. Extratos vegetais alcoólicos.

Concentração	<i>Staphylococcus choleraesuis</i>		<i>Shigella flexneri</i>	
	20%	10%	20%	10%
Alecrim	2,33 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>	23,33 <sup>I</sup>	24,83 <sup>I</sup>
Capim-limão	0,00 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>	22,83 <sup>I</sup>	26,00 <sup>I</sup>
Gengibre	6,33 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>	21,67 <sup>I</sup>	25,17 <sup>I</sup>
Hortelã	0,00 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>	24,17 <sup>I</sup>	13,67 <sup>I</sup>
Orégano	0,00 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>	24,17 <sup>I</sup>	14,00 <sup>I</sup>
Sálvia	0,00 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>	23,67 <sup>I</sup>	15,17 <sup>I</sup>
Etanol	0,00 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>	26,83 <sup>I</sup>	15,83 <sup>I</sup>
Vancomicina	-	-	-	-
Ampicilina	-	-	-	-
Ciprofloxacim	33,67 <sup>S</sup>	37,50 <sup>S</sup>	22,33 <sup>I</sup>	22,00 <sup>I</sup>
Clorexidina	-	-	-	-

<sup>R</sup> Resistente - halo de inibição inferior a 15 mm

<sup>I</sup> Intermediário - halo de inibição de 15 a 29 mm

<sup>S</sup> Sensível - halo de inibição de 30 a 35 mm

TABELA 8 Média dos diâmetros, em mm, dos halos de inibição da ação antimicrobianos. Extratos vegetais alcoólicos.

Concentração	<i>Streptococcus mitis</i>		<i>Streptococcus mutans</i>	
	20%	10%	20%	10%
Alecrim	5,17 <sup>R</sup>	5,17 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>
Capim-limão	6,50 <sup>R</sup>	7,33 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>
Gengibre	9,00 <sup>R</sup>	8,50 <sup>R</sup>	0,30 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>
Hortelã	0,50 <sup>R</sup>	4,67 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>
Orégano	4,17 <sup>R</sup>	4,17 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>
Sálvia	6,50 <sup>R</sup>	3,00 <sup>R</sup>	0,30 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>
Etanol	9,00 <sup>R</sup>	7,83 <sup>R</sup>	0,00 <sup>R</sup>	3,83 <sup>R</sup>
Vancomicina	-	-	-	-
Ampicilina	-	-	-	-
Ciprofloxacim	-	-	-	-
Clorexidina	5,67 <sup>R</sup>	12,33 <sup>R</sup>	1,83 <sup>R</sup>	13,00 <sup>R</sup>

<sup>R</sup> Resistente - halo de inibição inferior a 15 mm

<sup>I</sup> Intermediário - halo de inibição de 15 a 29 mm

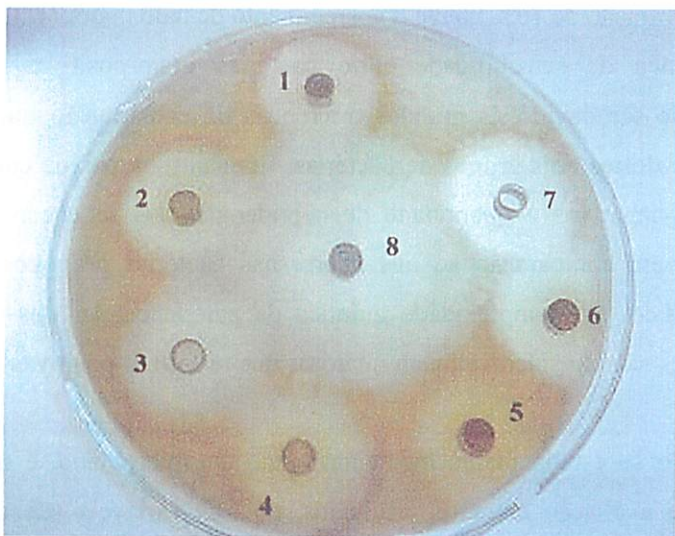
<sup>S</sup> Sensível - halo de inibição de 30 a 35 mm

De acordo com as médias dos halos de inibição obtidos nos antibiogramas, os diferentes extratos aquosos testados, não apresentaram efeito inibitório sobre *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella choleraesuis*, *Shigella flexneri*, *Streptococcus mitis* e *S. mutans* (Tabelas 3, 4 e 5). Foi, portanto, constatado que, nas concentrações utilizadas, estes extratos não exerceram atividade inibidora sobre os patógenos utilizados neste trabalho. Comparando os resultados para *Shigella flexneri* em todos os extratos alcoólicos a 20% verificou-se que apresentaram valores de médias de halos maiores que os a 10%, ou seja, quando aumentou a concentração do extrato, aumentou o tamanho do halo, mostrando que o aumento da concentração dos extratos interferiu no resultado, exceto para o alecrim e capim limão que houve redução da média do halo (Tabela 7).

Dentre os antibióticos utilizados para controle positivo, somente o

ciprofloxacim apresentou ação efetiva contra *S. choleraesuis*. Em *S. flexneri*, a ação deste antibiótico foi classificada como intermediária. A bactéria *S. aureus* apresentou resistência para vancomicina. Apesar de vários autores (Levy, 1997; Salyers & Amábile-Cuevas, 1997, Chartone-Souza, 1998) citarem que cepas de *S. aureus* multirresistentes são hoje comuns, limitando as opções terapêuticas apenas aos antibióticos vancomicina e teicoplanina, recentemente, foram isoladas linhagens mutantes com sensibilidade reduzida a vancomicina (Di Sálvio, 1998; Domin, 1998). Esses dados antecipam os problemas que poderão trazer essas linhagens multirresistentes, caso não surjam novos antimicrobianos ou terapias alternativas para combatê-los (Labischinski et al., 1998; Nogueira, 2000).

O maior potencial antimicrobiano foi verificado para *Shigella flexneri* em todos os extratos etanólicos a 20%, com exceção dos extratos de hortelã e de orégano, que apresentaram média dos halos de inibição inferior a 15 mm (Tabela 7 e Figura 2). Zaika (1988) propôs que as bactérias gram-positivas são mais resistentes que as gram-negativas para as propriedades antibacterianas dos óleos vegetais, o que contrasta com a hipótese proposta por Deans de que a suscetibilidade bacteriana para os óleos vegetais e a reação de Gram parecem ter uma pequena influência sobre a inibição do crescimento (Deans & Ritchie 1987; Deans et al. 1995). Os óleos voláteis de *Origanum vulgare*, por exemplo, parecem não ter igualmente efetividade contra microrganismos gram-positivos e gram-negativos, em contraste a Zaika (1988), Hussein (1990) e Smith-Palmer et al. (1998). Entretanto, outros óleos voláteis, como de *P. graveolens* e *T. vulgaris* apresentavam, preferencialmente, maior atividade com relação à reação de Gram, exercendo maior atividade inibitória contra organismos gram-positivos.



- 1 - Extrato de alecrim
- 2 - Extrato de capim-limão
- 3 - Extrato de gengibre
- 4 - Extrato de hortelã
- 5 - Extrato de orégano
- 6 - Extrato de sálvia
- 7 - Álcool 70%
- 8 - Ciprofloxacim

FIGURA 2 Formação de halos intermediários sobre *Shigella flexneri*, utilizando extratos alcoólicos a 20% de plantas medicinais aromáticas.

Para a bactéria *Shigella flexneri*, houve formação de halo com uma média de 2,33 mm para o extrato aquoso de sálvia a 20% e também para o extrato aquoso de sálvia a 10% (Tabela 4). A média do halo de inibição para ocasionado na presença do extrato aquoso de orégano a 20% foi de 2,33 mm e, para o extrato aquoso a 10% de orégano, continuou como a medida de 2,33 mm. Foi observado que o aumento da concentração do extrato, aumentou o tamanho médio do halo em mm em todos os extratos estudados, exceto o capim-limão

onde na concentração de 10% houve o aparecimento de halo maior (4,33 mm).

Diferença de sensibilidade entre bactérias gram-positivas e gram-negativas pode ser devido às grandes diferenças na constituição química da parede celular destes dois grupos de bactérias. Enquanto na parede celular dos gêneros gram-negativos a quantidade de peptidoglicanos se encontra numa fração menor em comparação ao que ocorre nas bactérias gram-positivas, o conteúdo lipídico e a complexidade química da parede celular das bactérias gram-negativas são consideravelmente maiores que nas gram-positivas (Pinto et al., 2001).

Quando se estuda planta medicinal como antimicrobiano, é notória a dificuldade de avaliação entre os resultados, pois as variáveis vão desde os aspectos do solo e climáticos que exercem influência na composição química, como o estágio do desenvolvimento do vegetal quando da coleta, parte da planta estudada, forma de preparar o material para estudo, até os protocolos seguidos nos experimentos (Auricchio et al., 2003).

Os resultados encontrados para a bactéria *Streptococcus mitis*, utilizando-se extrato alcoólico de gengibre a 20% obteve-se um diâmetro médio de halo de 9 mm, para extrato alcoólico de capim limão a 10%, o resultado foi de 7,33 mm e 6,5 mm para o extrato alcoólico de sálvia a 20% (Tabela 8). Para a bactéria *Staphylococcus aureus* os extratos aquosos que apresentaram valor médio de formação de halos em mm foram extrato aquoso a 20% de gengibre 9,17 mm, extrato aquoso de hortelã a 20% 8,33 mm e extrato aquoso de sálvia 7,17 mm (Tabela 3). *Listeria monocytogenes* apresentou o maior diâmetro de halo de inibição quando testada com o extrato de hortelã a 20% (halo de 2,33 mm) seguidos dos extratos aquosos a 10% de alecrim 1,83mm e extrato aquoso de gengibre, 1,83 mm.

Para a bactéria *Streptococcus mutans*, o extrato aquoso a 20% de capim-limão o resultado foi equivalente a 3 mm, extrato aquoso de hortelã 2,83 mm e

para o extrato aquoso a 20% de gengibre 2,67 mm.

O efeito antimicrobiano dos extratos aquosos (Tabelas 3, 4 e 5) e alcoólicos (TabelaS 6, 7 e 8) sobre *Staphylococcus aureus* não foi detectado nas concentrações utilizadas (10% e 20%), de acordo com NCCLS (2000). Pode-se observar que o aumento da concentração das plantas na preparação dos extratos afetou a formação de halos de inibição por *S. aureu*. Assim, o extrato de gengibre 20% destacou-se em relação aos demais extratos com média de 9,17 mm, seguido dos extratos de hortelã (8,33 mm), sálvia (7,17 mm), capim limão (5,17 mm), alecrim (2 mm) e orégano (2 mm).

O efeito antimicrobiano dos extratos aquosos e alcoólicos sobre *Listeria monocytogenes* não foi detectado nas concentrações utilizadas (10% e 20%). Quando o extrato de alecrim foi testado a 10%, a média de halo foi 1,83 mm. Quando o mesmo extrato (alecrim) foi testado com a concentração a 20%, a média de halo foi 1 mm, ou seja, houve uma diminuição no diâmetro do halo. Também houve diminuição no diâmetro dos halos com os extratos de capim-limão, gengibre, orégano. Entretanto com os extratos de hortelã e sálvia ocorreu o contrário, houve aumento no diâmetro do halo. O halo com maior diâmetro foi observado com o extrato de hortelã 20% (halo 2,33 mm).

Entretanto, observou-se que o aumento da concentração do extrato afetou a formação de halos nos extratos avaliados. Quando o extrato de sálvia foi testado a 20%, a média de halo foi 11,17 mm, seguido dos extratos de alecrim (6 mm), gengibre (4,67 mm), hortelã (2,83 mm), orégano (2,67 mm) e capim-limão (0,83 mm). *L. monocytogenes* mostrou-se com sensibilidade intermediária (29,5 mm, 29,33 mm e 30,83 mm) para o antibiótico ciprofloxacina (Figura 2) e 8,33 mm resistente).

O efeito antimicrobiano dos extratos aquosos foi nulo a 10% e 20% para *Salmonella choleraesuis*. A ação inibitória dos extratos alcoólicos sobre a *S. choleraesuis* foi nula nas concentrações das plantas medicinais utilizadas (10% e

20%), com exceção dos extratos alcoólicos de gengibre a 10% (6,33 mm) e alecrim a 20% (2,33 mm).

O efeito antimicrobiano dos extratos aquosos sobre *Shigella flexneri* pode ser observado nos resultados apresentados na Tabela 4. Pode-se observar que o aumento da concentração de extratos alterou a formação de halos. No caso de alguns extratos, houve aumento de halo quando aumentou-se a concentração do extrato das plantas para 20%. Quando o extrato de alecrim foi testado a 10%, a média de halo foi 4,33 mm. Quando o mesmo extrato (alecrim) foi testado com a concentração a 20%, a média de halo foi 2,67 mm, ou seja, houve diminuição no diâmetro do halo.

Para o extrato de sálvia houve uma formação de halo de 2,33 mm (a 20%) e 0 mm (a 10%); para o extrato de orégano formou-se um halo de 2,33 mm (a 20%) e 0 mm (a 10%). Para estes extratos, quando aumentou a concentração do extrato, aumentou o tamanho do halo, exceto no capim-limão.

O efeito antimicrobiano dos extratos alcoólicos sobre *S. flexneri* foi detectado nas concentrações utilizadas (10% e 20%), mostrando, na maioria dos casos, sensibilidade intermediária (de 16 mm a 29 mm). Entretanto, houve também formação de halo quando se utilizou apenas o solvente (etanol). Os extratos de capim limão 10% (26 mm), gengibre 10% (25,17 mm) e alecrim 10% (24,83 mm) apresentaram halos com diâmetro maior, quando comparados com os extratos a 20%. Os extratos de hortelã e orégano a 10% apresentaram halos com diâmetro de 13,67 mm e 14 mm, respectivamente, mostrando que *S. flexneri* mostrou-se resistente a esses dois extratos nessa concentração (Tabela 7). Entretanto, quando os extratos de hortelã e orégano foram testados a 20%, houve aumento nos diâmetros dos halos (24,17 mm para ambos os extratos), o que significou sensibilidade intermediária de *S. flexneri* aos extratos alcoólicos das plantas.

O efeito antimicrobiano dos extratos aquosos e alcoólicos sobre

*Streptococcus mitis* e *S. mutans* não foi detectado nas concentrações utilizadas (10% e 20%). Observou-se que sobre *S. mitis* a resposta proporcionada pela maioria dos extratos aquosos foi a mesma (nula) nas duas concentrações com exceção para o extrato de sálvia, que apresentou halo de 3 mm. Sobre *S. mutans* a resposta proporcionada por todos os extratos aquosos a 10% foi igual a *S. mitis*. Entretanto, com os extratos aquosos de gengibre, capim-limão, hortelã, e orégano preparados a 20% *S. mutans* apresentou halos com diâmetros de 3 mm, 2,83 mm e 2,67 mm (orégano), respectivamente.

A bactéria *S. mitis* nos extratos alcoólicos a 20%, apresentou os resultados: gengibre (9 mm), capim-limão (6,5 mm), sálvia (6,5 mm), alecrim (5,17 mm), orégano (4,17 mm) e hortelã (0,5 mm) e para os extratos alcoólicos a 10% de hortelã (4,67 mm) e capim-limão (7,33 mm) (Tabela 8).

Apesar da atividade antibacteriana dos óleos essenciais de plantas condimentares ter sido revisado (Nychas, 1995), seu mecanismo de ação contra microrganismo não tem sido estudado com grandes detalhes. Alguns autores sugerem que a ação antimicrobiana de óleos essenciais pode ser prejudicial para a atividade das enzimas responsáveis pela produção de energia e síntese de componentes estruturais (Cox et al., 1998; Helander et al., 1998; Ultee et al., 1999; Sikkema et al., 1995).

O conhecimento da extensão e modo de inibição de compostos específicos, os quais estão presentes em extratos de plantas, pode contribuir para o sucesso da aplicação de tais preservantes naturais em alimentos, levando em consideração que muitas combinações de compostos podem produzir alta inibição com menor impacto no “flavour”. Por essa razão, há crescimento de demanda para o conhecimento da concentração mínima inibitória efetiva (CMI) para os óleos essenciais para habilitar equilíbrio entre aceitabilidade sensorial e eficácia antimicrobiana.

De acordo com os resultados obtidos, sugere-se que outros trabalhos



sejam realizados utilizando-se os mesmos extratos avaliados, porém, em concentrações diferentes, e métodos de extração diferenciados. Nos extratos para os quais foram observados resultados intermediários, sugere-se pesquisar qual ou quais dos seus componentes são responsáveis pela sua atividade antimicrobiana, uma vez que Santos et al. (1999) citam que certos extratos só são bioativos quando juntos. Deve-se levar em consideração que nos extratos, pequenas porções da substância ativa podem estar presentes, uma vez que se trabalhou com pequenas quantidades das plantas.

Os resultados obtidos neste trabalho indicaram que os extratos possuem ação intermediária para alguns dos microrganismos avaliados, possibilitando assim, a utilização destas plantas no controle da placa bacteriana em odontologia ou como substâncias antimicrobianas na lavagem de legumes e verduras. Isso poderia controlar (inibir, reduzir ou destruir) o crescimento microbiano, aumentando a vida de prateleira de alguns alimentos, além de contribuir para a melhoria da qualidade de vida da população.

## 5 CONCLUSÕES

Nas condições avaliadas neste trabalho pode-se concluir que:

- A atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos a 20% de concentração das plantas *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Cymbopogon citratus* (capim limão), *Zingiber officinallis* (gengibre), *Mentha piperita* (hortelã), *Origanum vulgare* (orégano) e *Salvia officinalis* (sálvia) foi considerada intermediária para *Shigella flexneri*.
- Os resultados mostraram que o extrato etanólico de sálvia a 20% foi o mais eficiente no controle de *L. monocytogenes*.
- Para *S. mitis*, o extrato etanólico de gengibre a 20% apresentou a maior atividade antibacteriana.
- As demais bactérias avaliadas foram resistentes às concentrações dos extratos aquosos e etanólicos das plantas medicinais testadas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEGAZ, B.; YOHANNES, P.G. **Constituents of the essential oil of Ethiopian *Cymbopogon citrates* Stapf.** *Journal of Natural Products*, v.46, n.3, p.424-426, 1983.

ACCORSI, W.R. **Programa de plantas medicinais e fitoterapia: medicina popular e fitoterapia.** Piracicaba., ESALQ-USP, 1994. 81p. (Cursos Agrozootécnicos).

AGUIAR, M.L.B.A; MATOS, F.J.A; MOURA, V.R.A. **Atividade antibiótica de plantas da flora nordestina.** *Ciência Cult.*, v.36, p.547, 1984.

ALECRIM medicinal. Disponível em:  
<<http://www.achetudoeregiao.com.br/ANIMAIS/alecrim.htm>>. Acesso em: 21 maio 2004.

ALONSO-PAZ, E. et al. **Screening of Uruguayan medicinal plants for antimicrobial activity.** *Journal Ethnopharmacology*, v.45, p.67-70, 1995.

ANESINI, E.; PEREZ, C. Screening of plants used in Argentine folk medicine for antimicrobial activity. *Journal Ethnopharmacol*, v.39, p.119-128, 1993.

AURICCHIO, M.T.; BACCHI, E.M. Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga): Revisão. *Revista Inst. Adolfo Lutz*, v.62, n.1, p.55-61, 2003.

ARTIZZU, N. et al. Studies of the diuretic and antimicrobial activity of *Cynodon dactylon* essential oil. *Fitoterapia*, v.66, p.174-175, 1995.

BAYOUMI S. Bacteriostatic Effect of Some Spices and Their Utilization in the Manufacture of Yoghurt. *Chemie Mikrobiologie Technologie der Lebensmittel.*, v.14, p.21-26, 1992.

BEIGHTON, D.; RIPPON, H.R.; THOMAS, H.E.C. The distribution of *Streptococcus mutans* serotypes and dental caries in a group of 5- to 8-year-old Hampshire schoolchildren. *Br Dent Journal*, v.162, p103-106, 1987.

BENNIK, M.H.J. et al. Microbiology of minimally processed modified-atmosphere packaged chicory endive. **Postharvest Biology and Technology**, v.9, p.209-221, 1996.

BERGDOLL, M.S. Staphylococcal food poisoning. In: DEAN, C. **Foodborne diseases**. 4.ed. San Diego, California: Academic, 1990. p.85-106.

BHANDARI, U.; SHARMA, J.N.; ZAFAR, R. The protective action of Ethanolic Ginger (*Zingiber officinale*) extract in cholesterol fed rabbits. **Journal Ethnopharmacology**, v.61, n.2, p.167-171, June 1998.

BOVE, M. An encyclopedia of natural healing for children & infants. New Canaan: CT: Keats, 1996.

BOWEN, W.H. Do we need to be concerned about dental caries in the coming millennium? **Crit Rev Oral Biol Med.**, v.13, p.126-131, 2002.

BRATTHALL, D. Caries, views and perspectives. **Scand Jounal Dent Res**. v.100, p.47-51, 1992.

BRUNA, E.P. et al. Effects of Eucalyptus litter extracts on microbial growth. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.24, p.1523-1528, 1989.

CARLSSON, P.; OLSSON, B.; BRATTHALL, D. The relationship between the bacterium *Streptococcus mutans* in the saliva and dental caries in children in Mozambique. **Arch Oral Biology**, v.30, p.265-268, 1985.

CARRICONDE, C. et al. **Plantas medicinais e alimentícias**. Olinda: Centro Nordeste de Medicina Popular/Universidade Federal Rural de Pernambuco, 1996, v.1, p.45-47.

CASTRO, D.M. et al. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV. 2000.

CAUFIELD, P.W. Dental caries – a transmissible and infectious disease revisited: a position paper. **Pediatr Dent**. v.19, p.491-498, 1997.

CDC/NCID/DBMD. **Salmonellosis**. Estados Unidos, June 2001. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/salmonellosis.htm>>. Acesso em: 03 jul. 2004.

- CH CHIU. et al. Isolation of *Salmonella enterica* serotype choleraesuis resistant to ceftriaxone and ciprofloxacin. v.363, ed.9417, p.1285-1286, Apr. 2004.
- CHARTONE-SOUZA, E. Bactérias ultra-resistentes: uma guerra quase perdida. *Ciência Hoje*, v.23, p.138, p.26-35,1998.
- CHEN, H.C.; CHANG, M.D.; CHANG, T.J. Antibacterial properties of some spice plants before and after heat treatment. *Chung Hua Min Kuo Wei Sheng Wu Chi Mien I Hsueh Tsa Chih*. v.18, p.190-195, 1985.
- CHINIVASAGAM, H.N. et al.. Microbiological status of piggery effluent from 13 piggeries in south east Queensland region of Australia. *Journal Applied Microbiology*, v.97, n.5, p.883-891, 2004.
- CONNER, D.; BEAUCHAT, L. “Effetcts of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. *Journal Food Science*, v.49, n.429-434, 1984.
- COX, S.D. et al. Tea tree oil causes K + leakage andinhibits respiration in escherichia coli. *Letters in Applied Microbiology*, v.26, n.5, p.355-358, June 1998.
- COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev*. v.12, p.564-582, 1999.
- CRUZ, F.G. et al. Antibiotic activity of diterpenes from *Mikania triangularis*. *Fitoterapia*. v.67, p.189-190, 1996.
- DAVIS, P. *Aromaterapia*. São Paulo:. Martins Fontes. 1996. 507 p.
- DEANS, S.G.; RITCHIE, G. Antibacterial properties of plant essential oils. *International Journal of Food Microbiolgy*, v.5, p.165-180, 1987.
- DEANS, S.G. et al. Antimicrobial and antioxidant properties of *Syzygim aromaticum* (L.)Merr.& Perry: impact upon bacteria, fungi and fatty acid levels in ageing mice. *Flavour and Fragrance Journal*, v.10, p. 323-328, 1995.
- DEMPSEY, D.A.; SILVA, H.; KLESSIG, D.F. Engineering disease and pest resistance in plants. *Trends Microbiol.*, v.6, p. 54-61, 1993.

DI SÁLVIO, V. M. P. **Estudo da resistência a drogas em *Staphylococcus aureus* de origem hospitalar e obtenção de mutantes resistentes à vancomicina** . 1998. Dissertação (Mestrado em Microbiologia)-Universidade de Minas Gerais, Belo Horizonte.

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência - um guia de estudos multidisciplinar**. São Paulo: Universidade Paulista, 1996. 215p.

DOMIN, M.A. Highly virulent pathogens-a post antibiotic era? **Br. Journal Theatre. Nurs.**,v.8, n.2, p.14-18, 1998.

DUKE, J.A. **Handbook of medicinal herbs**. Boca Raton: CRC, 1985. p. 21-420.

EJECHI, B.O.; NWAFOR, O.E.; OKOKO, F.J. Growth inhibition of tomato-root fungi by phenolic acids and essential oil extracts of pepper fruit (*Denmetia tripetala*). **Food Research International**, v.32, n.6, p.395-399, jul. 1999.

EJECHI, B.O.; SOUZEY, J.A.; AKPOMEDAYE, D.E. Microbial stability of mango (*Mangifera indica* L.) juice preserved by combined application of mild heat and extracts of two tropical spices. **Journal Food Prot.** v.61, p.725-727, 1998.

ELLOF, J.N. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? **Journal Ethnopharmacol.** v.60, p.1-6, 1998.

FERREIRA, S.H. **Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências. 1998.

FOZO, E.; ROBERT QUIVEY, Jr. The fabM Gene Product of *Streptococcus mutans* is responsible for the synthesis **Journal of Bacteriology**, v.186, n.13, p.4152-4158, July, 2004.

FRANCO, B.D.G.H.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. p.46-50.

GAGLIARDI, J.V.; KARNS, J.S. Leaching of *Escherichia coli* O157:H7 in diverse soils under various agricultural management practices. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.3, p.877-883, 2000.

GHANNOUM, M.A. Studies on the anticandidal mode of action of *Allium sativum* (garlic). **Journal of General Microbiology**, v.134, p.2917-2924, 1988.

GIBBONS R.J. Adherent interactions which may affect microbial ecology in the mouth. **Journal Dent Res.**, v.63, p.378-385, 1984.

GIBBONS, R.J.; VAN HOUTE, J. Dental caries. **Annu Rev Med.** v.26, p.121-136, 1975.

GIBSON, A.C. **Ginger: zingiberaceae, família do Ginger.** Disponível em: <http://www.botgard.ucla.edu/html/botanytextbooks/economicbotany/Zingiber/>. Acesso em: 15 maio 2004.

GRADEL, K.O.; SAYERS, A.R.; DAVIES, R.H. Surface disinfection tests with *Salmonella* and a putative indicator bacterium, mimicking worst-case scenarios in Poultry Houses. **Poultry Science**, v.83, p.1636-1643, 2004.

HABERMEHL, G.G. Secondary and tertiary metabolites as plant toxins. **Toxicon.** v.36, p.1707-1719, 1998.

HAMMOND-KOSACK, K.; JONES, J.D.G. Plant disease resistance genes. **Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.** v.48, p575-607, 1997.

HELANDER, I.M. et al. Characterization of the action of selected essential oil components on Gramnegative bacteria. **Journal Agricultural Food Chem.**,v.46, p.3590-3595. 1998.

HENRY, F. J. The epidemiologic importance of dysentery in communities. **Review of Infectious Diseases** , v.13, p.S238-S244, 1991.

HOEPRICH, P. D.; JORDAN, M. C.; RONALDA, A. R. **Infectious diseases**, 5.ed. Philadelphia JB Lippincott, 1994.

HUSSEIN, A.M.S. Antibacterial and antifungal activities of some Libyan aromatic lants. **Planta Médica**, v.56, p. 644-649, 1990.

HUYCKE, M.M.; SAHM, D.F.; GILMORE, M.S. Multiple-drug resistant Enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. **Emerging Infectious Diseases**, v.4, p.239-249, 1998.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS. **Microorganisms in foods: microbial ecology of food commodities**. New York: Blackie Academic & Professional. 1998. v.6, 615 p.

JANSEN, A.M.; CHEFFER, J.J.C.; SVENDSEN, A.B. Antimicrobial activity of essential oils: a 1976-1986 literature review. Aspects of test methods. **Planta Med.** v.40, p.395-398, 1987.

JAY, J.M. **Microbiologia moderna de los alimentos**. 3.ed. Zaragoza-Espanha: Acribia, 1994. 804p.

JOLY, A.B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Nacional, 1983. p.583-586.

KLEIN M.I. **Transmissão, diversidade e estabilidade de genótipo de *Streptococcus mutans* e de *Streptococcus sobrinus*: estudo longitudinal em crianças**. 2003. Tese (Doutorado em Microbiologia)-Universidade de Campinas, Piracicaba.

KNOBLOCH, K. et al. Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. **Journal of Essential Oil Research**, v.1, p.119-128, 1989.

KÖHLER, B.; BRATTHALL, D. Practical method to facilitate estimation of *Streptococcus mutans* levels in saliva. **Journal Clinical Microbiology**, v.9, p.584-588, 1979.

KOLENBRANDER, P.E. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. **Annual Rev Microbiology**, v.54, p.413-437, 2000.

NGUEFACK, J.; BUDDE, B.B.; JAKOBSEN, M. Five essential oils from aromatic plants of Cameroon: their antibacterial activity and ability to permeabilize the cytoplasmic membrane of *Listeria innocua* examined by flow cytometry. **Letters in Applied Microbiology**, v.39, n.5, p.395, Nov. 2004.

LABISCHINSKI, H.; EHLERT, K. BERGER-BÄCHI, B. The targeting of factors necessary for the expression of methicillin resistance in staphylococci. **Journal Antimicrobial Chemother**, v.41, p.581-584, 1998.

LEAL, T.C.A.B. **Produção de óleo essencial de capim cidreira (*Cymbopogon citrates* (DC) Stapf) em função de fatores endógenos e exógenos**. 1998. 64p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal)-Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos de Goytacazes.



- LEMOS, T.L.G. et al.. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from Brazilian plants. **Fitoterapia**. v.63, p.266-268, 1992.
- LEVY, C.E. Aspectos Microbiológicos In: RODRIGUES, E.A.C. et al. **Infecções hospitalares: prevenção e controle**. São Paulo: Sarvier, 1997. p.591-598.
- LIMA, A.A.M. et al. High frequency of strains multiply resistant to ampicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole, streptomycin, chloramphenicol and tetracycline isolated from patients with shigellosis in Northeastern Brazil during the period 1988 to 1993. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v.39, p.256-259, 1995.
- LIS-BALCHIN, M.; DEANS, S.G. Bioactivity of selected plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Microbiology**. v.82, p.759-762, 1997.
- LOESCHE, W.J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. **Microbiol Rev**. v.50, p.353-80, 1986.
- MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Brock biology of microorganisms**. 8.ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1997. Cap.15/16/17. p.606-768.
- MARTINEZ, M.J. et al. Antimicrobial properties of argentatone A isolated from *Parthenium argentatum*. **Fitoterapia**. v.65, p.371-372, 1994
- MARTINEZ, M.J. et al. Screening of some Cuban medicinal plants for antimicrobial activity. **Journal Ethnopharmacol**, v.52, p.171-174, 1996.
- MARTINS, C.E.C.B. **Identificação de leveduras envolvidas no processo de ensilagem de cana-de-açúcar e utilização de extratos vegetais como seus inibidores**. 2004. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- MARTINS, E.R. et al. **Plantas medicinais**. Viçosa, MG: UFV, 1995.
- MARTINS, P.M. **Influência da temperatura e da velocidade do ar de secagem no teor e composição química do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* D.C. Stapf.)**. 2000. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

MASCHIO, J. País despreza suas plantas medicinais. **Folha de São Paulo**. São Paulo, 30 de jun. 1998. Caderno 6, p.1 (Agrofolha).

MASTEROVA, I. et al. Royleanones in the roots of *Salvia officinalis* L. of domestic provenance and their antimicrobial activity. **Ceska Slov Farm**. v.45, n.5, p.242–245, 1996.

MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas medicinais do Nordeste do Brasil**. Fortaleza: UFC, 1989.

MATOS, F.J.A.; AGUIAR, L.M.B.A.; SILVA, M.G.A. Chemical constituents and antimicrobial activity of *Vatairea macrocarpa* Ducke. **Acta Amazônica**, v.18, p.351-352, 1988.

MATTOS-GRANER, R. O. et al. Water-insoluble glucan synthesis by mutans streptococcal strains correlates with caries incidence in 12 to 30-months-old children. **Journal Dent Res.**, v.79, p.1371-1377, 2000.

MATTOS-GRANER, R.O. et al. Genotypic diversity of mutans streptococci in Brazilian nursery children suggests horizontal transmission. **Journal Clinical Microbiology**, v.39, p.2313-2316, 2001.

McBAIN, A.J.. et al. Effects of a Chlorhexidine Gluconate-containing mouthwash on the vitality and antimicrobial susceptibility of “*in vitro*” oral bacterial ecosystems. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.8, p.4770-4776, Aug. 2003.

MIMS, C.A. et al. **Microbiologia médica**. São Paulo: Manole. São Paulo, 1995.

MING, L.C. Plantas medicinais no ensino de 3º grau. In: CONGRESSO SUL-BRASILEIRO DE PLANTAS MEDICINAIS, 1, 1999, Maringá, Pr. **Mesa Redonda...** Maringá, 1999.

MORETTI, M.D.I. et al. **Microbiologia de los alimentos: fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la inocuidad y la calidad de los alimentos**. Zaragoza-Espanha: Acribia, 1983. 375p.

MOSSEL, D.A.A.; GARCIA, B.M. **Microbiologia de los alimentos: fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la inocuidad y la calidad de los alimentos**. Zaragoza-Espanha: Acribia, 1983. 375p.

MURRAY, M.T. **The healing power of herbs : the enlightened person's guide to the wonders of medicinal plants.** Rocklin, CA: Prima, 1995. xiv, 410.

MURRAY, P.R. et al. **Microbiologia médica.** 3.ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2000. 726p.

ERSIN, N.K. et al. **Transmission of *Streptococcus mutans* in a group of Turkish families,** v.19, n.6, p.408. dez. 2004.

NAKAMURA, C.V. et al. Antibacterial activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil. **Mem Inst Oswaldo Cruz,** Rio de Janeiro, v.94, n.5, p.675-678, Sept./Oct. 1999.

NASCIMENTO, G.G.F. et al. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal Microbiology,** v.31, n.4, p.247-256, Oct./Dec. 2000

NASCIMENTO, S.C.; CHIAPPETA, A.; LIMA, R.M.O.C. Antimicrobial and cytotoxic activities in plants from Pernambuco. **Brazil. Fitoterapia,** v.61, p.353-355, 1990.

NATIONAL COMMITTEE OF CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Performance standards for antimicrobial disc susceptibility tests.** Wayne, PA.: Approved Standard, M2-A7. 2000.

NGEFACK, J.; BUDDE, B.B.; JAKOBSEN, M. Five essential oils from aromatic plants of Cameroon: their antibacterial activity and ability to permeabilize the cytoplasmic membrane of *Listeria innocua* examined by flow cytometry. **Letters in Applied Microbiology,** v.39,n.5, p.395, Nov. 2004

NIMRI L.F.; ELNASSER, Z.; BATCHOUN, R. **Polymicrobial infections in children with diarrhoea in a rural area of Fordan.** v.42, n.2, p.255-259, Oct. 2004

NOGUEIRA, M. de S. **Pesquisa da atividade de produtos de origem vegetal, de grande uso popular, sobre o crescimento bacteriano e a transferência, por conjugação, de plasmídios R.** 2000. Dissertação (Mestrado em Microbiologia)-Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

NOJIMOTO, I.T.I. et al. Susceptibilidade aos antimicrobianos de *Listeria* spp. isoladas de pacientes com aborto repetitivo. **Revista Brasileira de Análises Clínicas,** v.26, n.3, p.71-74, 1994.

NOJIMOTO, I.T.I.; SOUZA, S.R.; VALADÃO, L.M. Ocorrência de *Listeria* spp em crianças da cidade de Goiânia-Goiás. **RBAC**. v.29, n.2, p.73-74, 1997.

NYCHAS, G.J.E. **Natural antimicrobial from plants**: i. G.W. Gould; new methods of food preservation, Blackie: Chapman & Hall, UK, 1995. p.58-89.

OKEKE, I.N., LAMIKANRA, A.; EDELMAN, R. Socioeconomic and behavioral factors leading to acquired bacterial resistance to antibiotics in developing countries. **Emerg. Infect. Dis.** v.5, p.18-27, 1999.

PARK, C.E.; AKHTAR, M.A.; RAYMAN, M.K. Evaluation of a commercial enzyme immunoassay Kit (RIDASCREEN) for detection of staphylococcal enterotoxins A, B, C, D and E in foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, n.2, p.677-681, Feb.1994.

PATTNAIK, S. et al. Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. **Microbiology**, v.89, p.39-46, 1997.

PAZHANI, G.P. et al. Clonal multidrug-resistant *Shigella dysenteriae* Type 1 Strains Associated with Epidemic and Sporadic Dysenteries in Eastern India. v.48, n.2, p.681-684, Feb.2004.

PEREIRA, M. L. et al. Enterotoxinas estafilocócicas: importância e métodos analíticos de detecção. **Higiene Alimentar**, v.13, n.64, p.24-34, set. 1999.

PEREIRA, M.L. et al. Estafilococos: até onde sua importância em alimentos? **Higiene Alimentar**, v.44, n.68/69, p.32-41, jan./fev. 2000.

PINTO, M.S. et al. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.38, n.6, 2001.

POZETTI, G.L. et al. Determinação da atividade antimicrobiana de plantas brasileiras. **Revista da Faculdade de Farmácia e Odontologia**, Araraquara, v.6, p.29-33, 1972.

RATTAN, A.; KALIA, A.; AHMAD, N. Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: Molecular Perspectives. **Emerg. Infect. Dis.**, v.4, p.195-20, 1998.

REINBOTHE, C.; DIETRICH, B.; LUCKNER, M.J. **Plant. Physiology**, v.137, p.224, 1990.

REYES, J.F. et al. Aislamiento de bacterias gram positivas de leche cruda com residuos de antimicrobianos. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, v.52, n.1, mar. 2002.

RODRIGUES, V.E.G. Levantamento florístico e etnobotânico de plantas medicinais dos cerrados na região do Alto do Rio Grande. Lavras, 1998. 235p.

ROMERIO, E.; TATEO, F.; DEBIAGGI, M. Antiviral activity of *Rosmarinus officinalis* L. extract. *Mitteilungen Aus Dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, v.80, p.113-119, 1989.

SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA PESCA Y ALIMENTOS. 2004. Orégano. [On line]. Disponível em: <http://siiap.sagyp.mecon.ar/new/0/agricultura/otros/aromaticas/Oregano/index.php>.> Acesso em: 10 ago. 2004.

SALYERS, A.A.; AMÁBILE-CUEVAS, C.F. Why are antibiotic genes so resistant to elimination? *Antimicrobial. Agent. Chemother*, v. 41, p.2321-2325, 1997.

SANTOS, K.R.N. et al. DNA typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: isolates and factors associated with nosocomial acquisition in two Brazilian university hospitals. *Journal of Medical Microbiology*. v.48, n.1, p.17-23, 1999.

SANTOS, P.R.V.; OLIVEIRA, A.C.X.; TOMASSINI, T.C.B. Controle microbiológico de produtos fitoterápicos. *Rev. Farm. Bioquím.*, v.31, p.35-38, 1995.

SANTOS FILHO, D. et al. Atividade antibacteriana de extratos vegetais. *Rev. Cien. Farm.* v.12, p.39-46, 1990.

SAXENA, G. et al. Antimicrobial constituents of *Rhus glabra*. *Journal Ethnopharmacol*, v.42, p.95-99, 1994.

SCHWARZ K.; TERNES W. Antioxidative constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*. I. Determination of phenolic diterpenes with antioxidative activity amongst tocochromanols using HPLC. *Z Lebsnm Unters Forsch.*, 1992;v.195,n.2p.95-98, 1992.

SENA, C.; VENTURI, M. *Origanum vulgare*: revisão de olericultura. 2002.

SHARMA, J.N.; ZAFAR, R. The protective action of Ethanolic Ginger (*Zingiber officinale*) extract in cholesterol fed rabbits. **Journal Ethnopharmacol**, v.61, n.2, p.167-71, June 1998.

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

SIMÕES, C.M.O et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3.ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2001.

SKANDAMIS, P.N.; NYCHAS, G.J.E. Preservation of fresh meat with active and modified atmosphere packaging conditions. **International Journal Food Microbiology**, v.79, p.35-45, 2002.

SMITH, D.J.; TAUBMAN, M.A. Vaccines against dental caries infection. In: LEVINE, M.M. et al. **New generation of vaccines**. New York: Marcel Dekker, 1997. p.913-930.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J. FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, p.118-122, 1998

STANGARLIN, R.J. et al.. Plantas medicinais e controle alternativos de fitopatógenos. **Biotecnol. Ciênc. Des.**, v.11, p.16-21, 1999.

THONGSON; P.M.C. et al. **Letters In Applied Microbiology**, v.39, p.401, nov. 2004.

TONG, H.C.; GAO, X.J.; DONG, X.Z. Non-mutans *streptococci* in patients receiving radiotherapy in the head and neck area. 2003. Disponível em: <<http://content.karger.com/produktedb/produkte.asp?aktion=showfulltext&produktnr>> Acesso em: 09 nov. 2004.

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

ULTEE, A.; KETS, E.P.W. ; SMID, E.J. **Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne Pathogen *Bacillus cereus***. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.10, p.4606-4610, Oct. 1999.

**VAN DENDER, A.G.F. *Listeria monocytogenes*: um problema em leite e produtos lácteos.** Informe Agropecuário, Brasília, v.13, n.155, p.19-23, 1995.

**WORWOOD, S. Aromaterapia: um guia de a a z para o uso terapêutico dos óleos essenciais.** São Paulo: Best Seller, 1995. 251p.

**YAMAHARA J, et al. Cholagogic effect of ginger and its active constituents.** Journal Ethnopharmacology, v.13, n.2, p.217, 1985.

**ZAICA, L.L. Spices and herbs: their antimicrobial activity and its determination.** Journal of Food Nutrition, v.9, p.97-118, 1988.

## ANEXOS

	<b>Página</b>
TABELA 1A Composição do meio de cultura brain heart infusion - BHI (pH 7,4 e 121°C/15 min) .....	60
TABELA 2A Composição do meio de cultura agar SS (para crescimento de <i>Shigella flexneri</i> ) .....	60
TABELA 3A Composição do meio de cultura agar Palcam (para crescimento de <i>Listeria monocytogenes</i> ) .....	61
TABELA 4A Composição do meio de cultura ágar Rambach (para crescimento de <i>Salmonella choleraesuis</i> ) .....	61
TABELA 5A Composição do meio de cultura ágar Baird-Parker (para crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> ) - pH 7,0 e 121°C/15 min .....	62
TABELA 6A Composição do meio de cultura Mueller-Hinton .....	62
TABELA 7A Composição do meio de cultura agar mitis salivarius (fórmula aproximada por litro) - pH final 7,0 ± 0,2 .....	63
TABELA 8A Composição do meio de cultura agar (caldo) tripticase de soja (TSA/TSB) - pH 7,3 e 121°C/15 min .....	63



TABELA 1A Composição do meio de cultura brain heart infusion - BHI (pH 7,4 e 121°C/15 min).

<b>Composição</b>	<b>Quantidades</b>
Infusão de cérebro de bezerro	200,0 g
Infusão de coração de boi	250,0 g
Proteose peptona	10,0 g
Dextrose	2,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Fosfato dissódico (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	2,5 g
Água destilada	1 litro

O meio de cultura BHI (3,7 g de BHI para 100 mL de água destilada) foi dividido em tubos contendo aproximadamente 10 mL cada, seguindo-se de sua esterilização em autoclave (121°C/20 min.). Após o resfriamento a temperatura ambiente, as células bacterianas foram inoculadas separadamente no meio de cultura líquido.

TABELA 2A Composição do meio de cultura ágar SS (para crescimento de *Shigella flexneri*).

<b>Composição</b>	<b>Quantidades</b>
Extrato de carne	5,0
Proteose-peptona	5,0
Lactose	10,0 g
Sais biliares	8,5 g
Citrato de sódio	8,5 g
Tiosulfato de sódio	8,5 g
Citrato férrico	1,0 g
Verde brilhante	0,00033 g
Vermelho neutro	0,025 g
Agar	1000 ml

O meio de cultura Ágar SS (60 g de Ágar SS para 1000 mL de água destilada) foi esterilizado em banho de água fervente, de acordo com fabricante. O conteúdo foi dividido em placas de petri contendo aproximadamente 19 mL de meio de cultura. Após o resfriamento e solidificação a temperatura ambiente, as células bacterianas foram inoculadas.

TABELA 3A Composição do meio de cultura agar Palcam (para crescimento de *Listeria monocytogenes*).

Composição	Quantidades
Peptona	23,0 g
Extrato de levedura	3,0 g
Amido	1,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Ágar-ágar	13,0 g
Manitol	10,0 g
Citrato férrico de amônio	0,5 g
Esculina	0,8 g
Glicose	0,5 g
Cloreto de lítio	15,0 g
Vermelho de fenol	0,08 g

Palcam Suplemento Seletivo SR 150.

Acriflavina, polimixina e Cloreto de lítio. Procedência Inglesa.

O meio de cultura Palcam (35,9 g de meio desidratado para 500 mL de água destilada e suplementado com um frasco de suplemento seletivo para Palcam). Após esterilização em autoclave (121°C/15 min.). O conteúdo foi dividido em placas de petri contendo aproximadamente 19 mL de meio de cultura. Após o resfriamento e solidificação a temperatura ambiente, as células bacterianas foram inoculadas.

TABELA 4A Composição do meio de cultura ágar Rambach (para crescimento de *Salmonella choleraesuis*).

Composição	Quantidades
Peptona	8,0 g
Propilen glicol	10,5 g
Desoxicolato de sódio	1,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Mistura cromogênica	1,5 g
Agar	15,0 g
Água destilada	1000 ml
Água destilada	940 ml

O meio de cultura Rambach (7,6 g de meio desidratado para 250 mL de água destilada) após esterilização em autoclave (121°C/15 min.) foi dividido em placas de petri contendo aproximadamente 19 mL de meio de cultura. Após o resfriamento e solidificação a temperatura ambiente, as células bacterianas foram inoculadas.

TABELA 5A Composição do meio de cultura ágar Baird-Parker (para crescimento de *Staphylococcus aureus*) - pH 7,0 e 121°C/15 min.

Composição	Quantidades
Triptona	10,0 g
Extrato de carne	5,0 g
Extrato de levedura	1,0 g
Piruvato de sódio	10,0 g
Glicina	12,0 g
Cloreto de lítio	5,0 g
Ágar	20,0 g
Água destilada	940 ml

**Suplemento**

Solução aquosa de telurito de potássio 1%	10,0ml/940ml base
Emulsão gema de ovo: salina (1:1 peso/peso)	50,0 ml/940ml/base

Ao meio de cultura Baird-Parker (63 g meio desidratado para 950 mL de água destilada), após esterilização em autoclave (121°C/20 min.), foram adicionados 50 mL de suplemento composto de gema de ovo e telurito. O meio de cultura foi distribuído em placas contendo aproximadamente 19 mL.

TABELA 6A Composição do meio de cultura Mueller-Hinton.

Composição	Quantidades
Infusão de carne	2,0 g
Hidrolisado de caseína	17,5 g
Amido	1,5 g
Ágar ágar	13,0 g

O meio de cultura Müller-Hinton (34 g de meio desidratado para 1000 mL de água destilada) após esterilização em autoclave (121°C/15 min.) foi dividido em placas de petri contendo aproximadamente 19 mL de meio de cultura. Após o resfriamento e solidificação a temperatura ambiente, as células bacterianas foram inoculadas.

**TABELA 7A** Composição do meio de cultura agar mitis salivarius (fórmula aproximada por litro) - pH final  $7,0 \pm 0,2$ .

<b>Composição</b>	<b>Quantidades</b>
Digerido pancreático de caseína	6,0 g
Peptona de proteose N° 3	9,0 g
Peptona de proteose	5,0 g
Dextrose	1,0 g
Sacarose	50,0 g
Fosfato dipotássico	0,0008 g
Agar	15,0 g

O meio de cultura Agar mitis-salivarius (90 g de meio desidratado para 1000 mL de água destilada) após esterilização em autoclave (121°C/15 min.) foi dividido em placas de petri contendo aproximadamente 19 mL de meio de cultura. Após o resfriamento e solidificação a temperatura ambiente, as células bacterianas foram inoculadas.

**TABELA 8A** Composição do meio de cultura agar (caldo) tripticase de soja (TSA/TSB) - pH 7,3 e 121°C/15 min.

<b>Composição</b>	<b>Quantidades</b>
Peptona de caseína	17,0 g
Peptona de soja	3,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Fosfato dipotássico ( $K_2HPO_1$ )	2,5 g
Dextrose	2,5 g
Água destilada	1 litro

O meio de cultura líquido Tripticase de soja (30 g de meio desidratado para 1000 mL de água destilada) após esterilização em autoclave (121°C/15 min.) foi dividido em tubos de ensaio contendo aproximadamente 9 mL de meio de cultura. Após o resfriamento a temperatura ambiente, as células bacterianas foram inoculadas.

Para o preparo do ágar tripticase de soja foram adicionados 8 gramas de ágar ao TSB.