

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE ÓLEOS
ESSENCIAIS FRENTE A BACTÉRIAS
ISOLADAS DE SURURU (*Mytella falcata*)**

ADENILDE RIBEIRO NASCIMENTO

2004

ADENILDE RIBEIRO NASCIMENTO

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS FRENTE A
BACTÉRIAS ISOLADAS DE SURURU (*Mytella falcata*)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação "Stricto Sensu" em Ciência dos Alimentos, para obtenção do título de "Doutor".

Orientadora

Profa. Dra. Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira

**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2004**

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

Nascimento, Adenilde Ribeiro

Atividade antibacteriana de óleos essenciais frente a bactérias
isoladas de sururu (*Mytella falcata*) / Adenilde Ribeiro Nascimento. –
Lavras: UFLA, 2004.

96 p.: il.

Orientadora: Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira.

Tese (Doutorado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Atividade antibacteriana. 2. Óleo essencial. 3. Bactéria. 4. Sururu.
I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

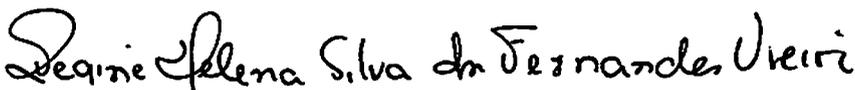
**CDD - 576.163
- 661.806**

ADENILDE RIBEIRO NASCIMENTO

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS FRENTE A
BACTÉRIAS ISOLADAS DE SURURU (*Mytella falcata*)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação "Stricto Sensu" em Ciência dos Alimentos, para obtenção do título de "Doutor".

APROVADA em 10 de Fevereiro 2004

Profa. Dra. Eliana Pinheiro de Carvalho	UFLA
Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli	UFLA
Profa. Dra. Maria Lúcia Pereira	FUNED
Prof. Dr. Henrique César Pereira Figueiredo	UFLA
	
Profa. Dra. Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira	
UFC	
(Orientadora)	

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

Dedicatória

Aos meus pais, José Raimundo Nascimento (*in memoriam*) e Elenilde Ribeiro Nascimento, minha eterna gratidão porque só a vós pertence toda esta felicidade.

Essa tese é para meu amado e companheiro, Prof. Dr. João Elias Mouchrek Filho. Pelo apoio, incentivo, respeito e amor dado para minha vida e por me fazer tão feliz.

Aos meus irmãos, irmãs, Agnaldo, Anazilda, Antonio Henrique, Elenilde, Maria Luzia, José Raimundo, Rita de Cássia e Francisco Carlos. Aos sobrinhos e sobrinhas, Agmar, Ariane, Rose, Jôse, Agnaldo Júnior, Marcos, Fábio, Elenice, Felipe Thiago, Arimatéa, Raissa, Thomas Jefferson, Williana.

Bem-aventurado aquele que teme ao Senhor e anda nos seus caminhos!

Sal. 128.1

Canção do óleo essencial

Regine Limaverde

Há muito descobriram meus segredos.
Perfumo alcovas,
mulheres me usam para tentar seus homens.
Cheiro na cabeça de bebês e velhos.
Sou apreciado no oriente e ocidente
e muito cheio de mim mesmo.
Ungi religiosos,
aplaquei a dor das feridas de Cristo,
sou usado pelo pobre e o rico.
Descobriram-me curando doenças.
Agora sou mais importante ainda.
Sou uma reserva para os médicos,
até me comparam a remédios de
última geração e ganhei na disputa.
Sou mais acessível ao bolso do pobre
e mais fácil de ser encontrado.
Vivo nas montanhas, nas florestas e nos jardins.
Serei um dia usado do Norte ao Sul.
Serei respeitado e querido.
Possuo poderes entranhados nos meus perfumes.
Dependendo de qual planta me escolherem
posso e quero salvar vidas.
Combato bactérias e fungos
e quem sabe um dia serei REI.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos, Senhor, por tudo; pelo amor, pela garra e por todos os momentos, até mesmo os mais difíceis, já que, com estes, alcançamos a maior das graças: a persistência!

Obrigada a todos que contribuíram para a realização deste trabalho, em especial à amiga e orientadora Profª. Dra. Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira, que muito ajudou com seu saber.

À minha co-orientadora, Profª. Dra. Eliana Pinheiro de Carvalho, pela orientação, estímulo, carinho e amizade.

À Profª. Dra. Leda Hagler Mendonça que não mediu esforços para me ajudar a obter o título de doutora.

Ao Prof. Dr. Manuel Andrade Neto, do Departamento de Química Orgânica da Universidade Federal do Ceará, pela doação dos óleos essenciais.

À Profª. Dra. Roberta H. Piccoli, pela amizade, receptividade e carinho.

À Profª. MSc. Lúcia Maria Alves Coelho, da Universidade Estadual do Maranhão, pela valiosa e incansável colaboração.

À Profª. MSc. Clotilde Oliveira Martins, pelos primeiros ensinamentos transmitidos de microbiologia, que foram essenciais para a vida acadêmica.

Ao Prof. Dr. Gustavo Hitzschky, pela ajuda na correção deste trabalho.

Aos Professores do Departamento de Ciências dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras.

À minha amiga Maria José Alvarenga, pela amizade, carinho, apoio e compreensão.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal de Lavras, especialmente Eliane M. C. Alcântara, pela colaboração e amizade.

Ao Prof. Dr. Victor E. Mouchrek Filho, da Universidade Federal do Maranhão, pela valiosa contribuição, em nos ter cedidos alguns óleos essenciais e meios de cultura.

Ao Prof. Dr. Jamal da Silva Chaar, da Universidade Federal do Amazonas, pela contribuição na realização deste trabalho.

Aos Professores do Departamento de Tecnologia Química da Universidade Federal do Maranhão.

Aos colegas e amigas do curso de doutorado, Maria Marlúcia, Odívia, Roberto, Alexandre e Cristiane, pelo companheirismo.

À turma do Laboratório de Ciência do Mar, Hilda, Oscarina, Suzy e Norma, pela amizade.

À turma dos laboratórios do Pavilhão Tecnológico da UFMA, Paula, José Walter, Goreth, Paulo, Aldo, Laelcio, Diana, Jane, Regiane, Liana, Jullius e Éric.

Aos amigos e colegas Professores Mestres Armando Barbosa Bayma e Nestor Ewerton Mendes Filho.

Às amigas queridas Maria do Socorro Oliveira Mouchrek, Maria Raimunda (Dica) e Marirah, pela amizade e convivência de longos anos.

Aos meus amigos Silvio Marinho, André Gustavo e Carmen Serra, pela grande ajuda durante o trabalho.

À bibliotecária Maria Raimunda Vieira dos Santos, pela ajuda na normalização deste trabalho.

À minha madrinha Nazilde Ribeiro, pelo carinho.

À Universidade Federal do Maranhão, pela oportunidade.

À CAPES, pelo apoio financeiro durante o desenvolvimento desta pesquisa.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	5
2.1 Plantas medicinais.....	5
2.2 Óleos essenciais.....	7
2.3 Goiabeira, <i>Psidium guajava</i> L.....	10
2.4 Alfavaca, <i>Ocimum gratissimum</i> L.....	14
2.5 Gengibre, <i>Zingiber officinale</i> Roscoe.....	16
2.6 Pimenta dióica, <i>Pimenta dioica</i> Lindl.....	18
2.7 Pau-rosa, <i>Aniba duckei</i> Kostermans.....	21
2.8 Importância do pescado como veículo nas doenças transmitidas por alimentos (DTA).....	22
2.8.1 Sururu, <i>Mytella falcata</i> d'Orbigny.....	24
2.9 Patógenos em moluscos bivalves.....	28
2.9.1 <i>Salmonella</i>	28
2.9.2 <i>Escherichia coli</i>	30
2.9.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	33
2.9.4 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	36
2.10 Doenças transmitidas por alimentos (DTAs).....	38
2.11 Resistência bacteriana.....	40
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	44
3.1 Obtenção dos óleos.....	44
3.2 Isolamento das cepas testes a partir de sururu, <i>Mytella falcata</i> d'Orbigny.....	44
3.3 Isolamento e identificação das bactérias do molusco.....	45
3.3.1 <i>Escherichia coli</i>	45
3.3.2 <i>Salmonella</i> spp.....	45
3.3.2.1 Pré-enriquecimento.....	46
3.3.2.2 Enriquecimento seletivo.....	46
3.3.2.3 Plaqueamento seletivo.....	46
3.3.2.4 Identificação presuntiva.....	46
3.3.2.5 Testes para confirmação.....	47
3.3.3 Pesquisa de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva.....	47
3.3.3.1 Confirmação das colônias típicas.....	47

3.3.3.2	Teste de coagulase	47
3.3.3.3	Teste de catalase	48
3.3.3.4	Teste de termonuclease	48
3.3.3.5	Coloração de gram	48
3.3.3.6	Utilização dos carboidratos, glicose e manitol em anaerobiose	49
3.3.3.7	Teste de Voges-Proskauer – produção de acetoina	49
3.3.4	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	49
3.3.4.1	Prova de produção de citocromo-oxidase	50
3.3.4.2	Prova da hidrólise da arginina e da descarboxilação da lisina e ornitina	50
3.3.4.3	Prova do halofilismo	51
3.3.4.4	Prova de Voges-Proskauer	51
3.3.4.5	Prova da fermentação de carboidratos	52
3.3.4.6	Prova de crescimento a 42°C	52
3.3.4.7	Cepas-controle	52
3.4	Testes de susceptibilidade aos óleos essenciais	52
3.4.1	Método de difusão de discos (MDD)	53
3.4.2	Método de difusão radial em duas camadas de ágar perfurado (MDRCAP)	53
3.5	Susceptibilidade das cepas isoladas de molusco aos antimicrobianos convencionais	54
3.5.1	Preparo do inóculo	54
3.5.2	Semeadura das placas	54
3.5.3	Aplicação dos discos	55
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5	CONCLUSÕES	74
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

RESUMO

NASCIMENTO, Adenilde Ribeiro. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais frente a bactérias isoladas de sururu (*Mytella falcata*).** 2004. 96 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

O aumento no número de bactérias resistentes à terapia antimicrobiana convencional tem estimulado a pesquisa de alternativas capazes de superar o problema. Desde a Antigüidade, são conhecidas propriedades terapêuticas de algumas plantas. Na presente pesquisa, foi investigada a atividade antimicrobiana de cinco óleos essenciais; goiabeira, *Psidium guajava* L.; alfavaca, *Ocimum gratissimum* L.; gengibre, *Zingiber officinale* Roscoe.; pau-rosa, *Aniba duckei* Kostermans e pimenta dióica, *Pimenta dioica* Lindl, sobre três cepas de *Escherichia coli*, três de *Salmonella* spp, três de *Vibrio parahaemolyticus* e três de *Staphylococcus* coagulase positiva, isoladas de sururu (*Mytella falcata*). Estes moluscos bivalves foram coletados em quatro estuários e quatro feiras de São Luís, Maranhão. Todas as cepas utilizadas para os testes de atividade antibacteriana foram selecionadas aleatoriamente. Foram usados dois métodos distintos: difusão de disco (MDD) e difusão radial em duas camadas de ágar perfurado (MDRCAP) e os resultados foram comparados àqueles obtidos a partir de doze antimicrobianos comerciais, pelo método de sensibilidade a disco segundo Kirby-Bauer. O óleo essencial de pau-rosa obteve melhor atividade antibacteriana. A atividade antibacteriana dos óleos contra as bactérias testadas demonstra a importância dessas plantas como alternativa natural de baixo custo para a prática terapêutica.

¹ Comitê Orientador: Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira – UFC (Orientadora) e Eliana Pinheiro de Carvalho – UFLA (Co-Orientadora)

ABSTRACT

NASCIMENTO, Adenilde Ribeiro. **Antibacterial activity of essential oils against isolated bacteria of mussel (*Mytella falcata*)**. 2004. 96 p. Thesis (Doctorate in Food Science) – Lavras, UFLA.¹

The increase in number of bacteria resistant to conventional antimicrobial therapy has encouraged researches of alternatives to overcome this problem. Since ancient times many therapeutic properties of plants are known. The present research studied the antibacterial activity of five essential oils extracted from guava tree, *Psidium guajava* L.; basil, *Ocimum gratissimum* L.; ginger, *Zingiber officinale* Roscoe; rosewood, *Aniba duckei* Kostermans and allspice, *Pimenta dioica* Lindl. The antibacterial activity was carried out against three strains of each of the following bacteria species: *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Vibrio parahaemolyticus* and *Staphylococcus* positive coagulase isolated from *Mytella falcata*. The mussels were collected from four estuaries and fish markets in São Luís, Maranhão State, Brazil. All bacteria strains used for the antimicrobial tests were randomly selected. Two distinct methods were used: disc diffusion (DDM) and radial diffusion in two layers of perforated agar (RDLPAM). Results were compared to those obtained from twelve commercial antimicrobials through the disc-sensitivity method according to Kirby-Bauer. The essential oil of rosewood showed a better antibacterian activity. The antibacterian activity of the oils tested against all the bacteria strains indicates that the plants studied can be used as a low cost natural alternative for therapeutic practices.

¹ Guidance Committee: Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira – UFC (Advisor) e Eliana Pinheiro de Carvalho – UFLA.

1 INTRODUÇÃO

Desde a Antigüidade são conhecidas as propriedades biológicas dos óleos essenciais extraídos de plantas aromáticas e medicinais. Atualmente, o uso de compostos antimicrobianos naturais tem se intensificado na conservação de alimentos e no controle de enfermidades de origem microbiana em humanos, animais e vegetais. Diferentes óleos essenciais têm sido obtidos de espécies aromáticas com atividade antibacteriana e antifúngica (Smith-Palmer et al., 1998; Baratta et al., 1998).

Apesar do conhecimento do uso de plantas medicinais ser muito antigo, remontando à época da Revolução Industrial, com o crescimento da indústria química diminuiu a utilização dessas plantas, para se dar atenção às drogas sintéticas. Nos dias de hoje, a procura por essas plantas tem aumentado, o que mostra a preocupação do homem moderno na busca por uma vida mais saudável.

Os óleos essenciais são misturas químicas complexas, formados por mais de cem componentes, responsáveis pelo seu odor e aroma. Diferentes partes das plantas têm sido usadas para obtenção do óleo essencial: flores, folhas, sementes, raízes, cascas e tubérculos (Aridogan et al., 2002).

A Organização Mundial de Saúde recentemente catalogou mais de 20.000 espécies de plantas medicinais com possibilidade de uso em diversas doenças tais como pneumonia, úlceras, diarreias, bronquites, resfriados e doenças do trato respiratório (Ali-Shtayeh et al., 1998).

Em muitos países existe uma rica tradição no uso de ervas medicinais para o tratamento de várias doenças infecciosas. No Brasil, o uso de compostos de plantas para fins farmacêuticos tem progressivamente aumentado (Nascimento et al., 2000; Rates, 2001).

Segundo França (1999), a utilização de determinadas partes de plantas consideradas medicinais tem resultado em intenso extrativismo em diversas regiões, induzindo assim a reprodução dessas espécies como indispensável à preservação da biodiversidade nativa.

Doenças como a diarreia são facilmente adquiridas pelo consumo de pescados contaminados e os moluscos, por seu tipo de alimentação, filtradores, são uma classe de pescado indicadora da poluição do meio onde são capturados.

O sururu *Mytella falcata* (d'Orbigny) é um molusco bivalve, pertencente à família dos Mytilidae. Por ser uma fonte protéica com significativo valor biológico, é nutricionalmente importante. Além disso, tem valor comercial e um grande potencial de produção. Para a população de baixa renda esse é um tipo de alimento alternativo, que permite manter uma dieta rica em nutrientes essenciais.

No Brasil, as reentrâncias do golfo maranhense abrigam um considerável estoque desse molusco. As espécies mais importantes da região, sob o ponto de vista econômico, são a *Mytella falcata* e a *Mytella guyanensis*, conhecidas popularmente pelos nomes de sururu-de-pasta e sururu-de-dedo, respectivamente.

Os moluscos, em particular os bivalves, são organismos marinhos que se alimentam principalmente de microalgas, entre as quais se destacam as diatomáceas dinoflageladas (Eskinazi & Sato, 1964).

A alimentação do sururu é feita por um processo de filtração mediante a utilização de seus sifões, onde são retidas as partículas indesejáveis, entre as quais a sílica. Desse modo, quando o indivíduo não sofre um processo de depuração adequado, ao ser colocado na boca, provoca uma sensação desagradável ao consumidor (Arcisz & Kelly, 1955).

Sua captura ocorre em águas estuarinas e marinhas, ambientes aquáticos, onde muitas vezes há o aporte de esgotos domésticos e industriais. Sendo

filtradores e bioacumuladores, sua microbiota é dependente da qualidade do habitat.

Estes moluscos, após captura, são geralmente transportados vivos e manipulados, muitas das vezes, com ou sem concha. Sua comercialização ocorre em feiras livres e mercados, permanecendo expostos por um tempo significativo, sempre acondicionados em temperatura e ambientes inadequados, o que evidentemente facilita a contaminação.

As doenças gastrointestinais, principalmente veiculadas por enterobactérias, são responsáveis por altas taxas de morbidade e mortalidade em vários países em desenvolvimento e subdesenvolvidos. Por outro lado, a presença de enterobactérias em alimentos também tem sido referenciada como a principal causa de diarreia e disenteria entre as populações infantis e, sob circunstância de baixa imunidade, pode levar a sérias conseqüências. (Lutterodt, 1989; Cáceres et al., 1993).

Para Angelillo et al. (2000), alguns surtos de doenças transmitidos por alimentos, reportados na literatura, freqüentemente estão associados com contaminações cruzadas, armazenamento e/ou cozimento inadequados, manutenção dos alimentos em temperatura ambiente por longo tempo, contaminação de alimentos crus e falta de higiene pessoal dos manipuladores.

Segundo Davis (1994) e Robin et al. (1998), as doenças infecciosas são as principais causas de mortes infantis no mundo todo, morrendo quase 50.000 pessoas, diariamente, devido a doenças causadas por bactérias patogênicas que muitas vezes apresentam multiresistência às drogas.

Tendo em vista o desconhecimento da atividade antibiótica de algumas plantas medicinais comumente usadas no combate de doenças e considerando que o sururu é um recurso pesqueiro, com elevada contribuição para a economia da cidade de São Luís, MA, o presente trabalho avalia a atividade antibiótica de

óleos essenciais extraídos de cinco plantas da flora brasileira, em relação as bactérias *Salmonella* spp, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* coagulase positiva e *Vibrio parahaemolyticus*, limitadas na Resolução da Diretoria Colegiada nº 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2001).As bactérias utilizadas neste trabalho foram isoladas de sururu *in natura* capturado de quatro estuários e comercializado em quatro feiras livres de pescado de São Luís,MA. O presente trabalho tem como objetivo:

a) comparar a qualidade de sururus *Mytella falcata* adquiridos em feiras de pescado e *in natura* capturados em quatro estuários da cidade de S.Luís- MA.

b) isolar e identificar cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella*, estafilococos coagulase positiva e *Vibrio parahaemolyticus* dos moluscos.

c) avaliar cientificamente a atividade antibiótica de algumas plantas medicinais empiricamente usadas no combate a doenças infecciosas;

d) medir a atividade antimicrobiana de cinco óleos dessas plantas no combate a bactérias isoladas de moluscos (sururu) *in natura* capturados de quatro estuários e comercializados em quatro feiras de pescado da cidade de São Luís, MA.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Plantas medicinais

O uso de produto natural com propriedades terapêuticas é tão antigo quanto a civilização humana e por um longo período, os minerais, plantas e animais foram as principais fontes de medicamentos. Mas, o advento da Revolução Industrial e o desenvolvimento da química orgânica resultaram na preferência de produtos sintéticos para o tratamento farmacológico (Rates, 2001).

Na época pré-histórica, a população usava plantas medicinais para combater diversas doenças, tais como bronquite, úlceras, pneumonia, infecções do trato urinário, vaginites, cervicites, desordens gastrintestinais e infecções da pele, como herpes simples (Anesini & Perez, 1993; Essawi & Srour, 2000).

Muitas espécies de plantas têm sido usadas, ao longo dos anos, na medicina tradicional, para o tratamento de diversas doenças (Ali-Shtayeh et al., 1998). Segundo Facey et al. (1999), investigações químicas e biológicas de plantas têm sido incentivadas com o propósito de substituir medicamentos alopáticos, comumente usados pelos fitoterapêuticos.

As plantas medicinais usadas tradicionalmente possuem uma variedade de compostos com propriedades terapêuticas conhecidas. Recentemente, as propriedades antimicrobianas de plantas medicinais estão cada vez mais sendo reportadas em diferentes partes do mundo (Ahmad & Beg, 2001).

A fitoterapia constitui uma forma de terapia medicinal que vem crescendo, notadamente nestes últimos anos, a ponto de atualmente o mercado mundial de fitoterápicos acumular lucros em torno de 22 bilhões de dólares.

Dentro dessa perspectiva, espera-se que o Brasil seja um país privilegiado, considerando sua extensa e diversificada flora (Yunes et al., 2001).

O uso de plantas medicinais pela população mundial tem sido significativo, nos últimos tempos. A Organização Mundial de Saúde (OMS) tem incentivado essa prática em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. Estima-se que 80% da população ainda utilizam direta ou indiretamente, as plantas para o tratamento de saúde (Akerelle, 1993).

A aplicação de plantas medicinais no mundo, e especialmente na América do Sul, tem contribuído significativamente para a saúde humana. Contudo, as plantas são usadas na forma de extratos crus, infusões ou emplastro para o tratamento de infecções comuns, sem qualquer evidência científica de sua eficácia (Holetz et al., 2002).

No Brasil, são amplamente usadas em formulações de remédios caseiros como chás, cocção, tinturas, xaropes e pó (Rates, 2001). Também são utilizadas de forma popular para o tratamento de problemas gastrintestinais, podendo ser ingeridas como chás, infusões ou cozidas (Matos, 1994).

Segundo Essawi & Srour (2000), em vários países as plantas medicinais são usadas como agentes antibacterianos, antifúngicos e antivirais.

Cáceres et al. (1993) citam que várias plantas usadas na Guatemala para o tratamento de infecções gastrintestinais possuem atividades antimicrobianas e são usadas no combate às bactérias enteropatogênicas, tais como a *Escherichia coli*, *Salmonella Enteritidis* e *Shigella flexneri*.

Em países do Terceiro Mundo, as doenças diarreicas são responsáveis pela morte de milhões de pessoas a cada ano, causando sérios problemas de saúde pública. Por outro lado, as diarreias continuam sendo uma das principais causas de mortalidade e morbidade, especialmente em crianças; desse modo, há

necessidade de medicamentos com ação eficaz sobre as cepas patogênicas resistentes causadoras dessas síndromes (Almeida et al., 1995).

Segundo Lin et al. (2002), em países em desenvolvimento, onde a maioria das pessoas vive quase que exclusivamente em áreas rurais, a medicina popular é usada para todos os tipos de doenças.

De acordo com Davis (1994), a descoberta de novos compostos antimicrobianos tem despertado interesse devido a um aumento na taxa de infecções causadas por microrganismos resistentes a diversos antibióticos. Salvat (2001) relatou que muitas pesquisas com substâncias biologicamente ativas, de plantas medicinais, têm sido fontes de agentes terapêuticos muito úteis.

Para Facey et al. (1999) a pesquisa por novos agentes antibacterianos tem se intensificado nas últimas décadas, principalmente por causa do aumento das infecções bacterianas, especialmente em países com populações jovens e também pelo aumento de cepas bacterianas resistentes aos antibióticos já rotineiramente usados e com frequência cada vez maior.

Segundo Eloff (1999), compostos tais como a benzoína e a emetina, conhecidos por suas propriedades inibidoras microbianas, têm sido isolados de plantas medicinais.

Elgayyar et al. (2001) também citam que extratos de diversos tipos de plantas são usados como agentes flavorizantes em alimentos e bebidas utilizados terapêuticamente.

2.2 Óleos essenciais

A utilização do óleo essencial como agente medicinal é conhecida desde épocas remotas. Há seis mil anos, os egípcios já utilizavam em práticas

religiosas associadas à cura de males, às unções da realeza e à busca de bem-estar físico, por meio dos aromas de partes específicas de certos vegetais (Tyrrel, 1990).

O uso das substâncias aromáticas disseminou-se por Israel, Grécia, Roma e todo o Mediterrâneo. A Índia é, provavelmente, o único lugar do mundo com mais de dez mil anos de conhecimento nesse assunto, sendo a medicina Ayurvédica a mais antiga forma de prática com substâncias aromáticas (Lavabre, 1992).

As substâncias aromáticas também já eram populares na antiga China e Índia, centenas de anos antes da era cristã, quando eram incorporadas a incensos, poções e vários tipos de acessórios, usados diretamente sobre o corpo. No entanto, foi apenas a partir da Idade Média, após o processo de destilação introduzido pelos cientistas muçulmanos, que se iniciou a real comercialização de ervas aromáticas (Tyrrel, 1990). Segundo Davidson (2001) os egípcios já usavam, no ano de 1500 a.C. os óleos essenciais como agentes conservantes em alimentos e também na medicina, para a preservação de cadáveres.

De acordo com Aridogan et al. (2002), os óleos essenciais são misturas químicas complexas com vários componentes responsáveis pelos aromas e sabores característicos. Diferentes partes das plantas são usadas na sua extração, dentre as quais flores, folhas, sementes, raízes e casca.

Os óleos essenciais possuem uma variedade de compostos químicos tais como: terpenos, seisquiterpenos, fenóis, álcoois ésteres, aldeídos, cetonas, compostos nitrogenados e sulfurados (Lavabre, 1992). Devido à sua complexa composição, demonstram uma grande variedade de ações farmacológicas.

Os óleos essenciais são também largamente utilizados na indústria como aromatizantes na preparação de perfumes, sabões, desinfetantes e cosméticos, assim como na indústria alimentícia (Craveiro et al., 1981).

Além do mais, os compostos voláteis derivados dos óleos essenciais possuem conhecidas atividades antibacterianas, antifúngicas, antivirais, inseticidas, herbicidas e antioxidantes (Essawi & Srour, 2000; Aridogan et al., 2002; Cimanga, 2002).

Díaz & Jorge (2001) relatam que numerosas investigações têm sido realizadas, em busca de novos compostos com atividades biológicas a partir de fontes naturais, destacando-se o óleo essencial de plantas medicinais e aromáticas, conhecidos pelas suas propriedades antimicrobianas.

Para Smith-Palmer et al. (1998), alguns métodos alternativos para a conservação de alimentos têm sido aplicados a partir de extratos de plantas e óleos essenciais, contra bactérias e fungos patogênicos.

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais está associada à presença de vários componentes, como timol, carvacrol, eugenol, cineol, linalol, terpineol, pipeno, cariofileno e citral (Lemos et al., 1990; Mahmoud, 1994; Ansari et al., 1996). Outros compostos extraídos de plantas tais como carvacrol, citronellol, eugenol, geraniol e limoneno foram testados como conservantes de alimentos com muita eficácia, sem qualquer demonstração mutagênica celular (Svoboda & Hampson, 1999).

Segundo Imai et al. (2001), os óleos essenciais e seus constituintes podem ser úteis como antibacterianos, sendo portanto, usados na inibição do crescimento de agentes patogênicos. Para Aridogan et al. (2002) os óleos essenciais possuem muitos efeitos terapêuticos, como o de vasodilatador, hipersecretor e estimulador de músculos. Atualmente, muitos são também empregados como fungicidas e nematicidas.

Estudos farmacológicos realizados com óleos essenciais de 15 espécies de plantas aromáticas brasileiras mostraram atividades compatíveis com o uso na

medicina popular, demonstrando atividades analgésica, antiinflamatória, anticonvulsiva, antiespasmódica e antibacteriana (Leal-Cardoso & Fonteles, 1999).

2.3 Goiabeira, *Psidium guajava* L.

A espécie *Psidium guajava* L., comumente conhecida por goiabeira (Figura 1), pertence à família Myrtaceae e distribui-se do México até o Estado de São Paulo, sendo indígena no México, na América Central e em parte da América do Sul (entre a Colômbia e o Peru) (Corrêa, 1984; Martínez et al., 1997).

Na Ásia e África, *Psidium guajava* L. é usada na prevenção e tratamento de escorbuto. Na Bolívia, Egito e Índia é usada no tratamento de várias doenças, incluindo tosses e doenças pulmonares. Na China, as folhas são usadas como antiinflamatórias e como agente hemostático. Além disso, neste país, o produto da cocção das folhas é usado para o tratamento de cólera, na redução de vômitos e diarreia. No México, as folhas, devido à presença dos princípios ativos da quercetina e glicosídeos, são extensivamente usadas como antidiarreica. No Brasil, o chá dos brotos é muito usado no tratamento de diarreias (Cáceres et al., 1993; Matos, 1994; Olajide et al., 1999; Jaiarj et al., 1999; Lin et al., 2002).

No Brasil, a goiabeira é uma importante planta medicinal e a casca da árvore é muito usada no tratamento de diarreia infantil, cólera e úlceras; as folhas e raízes também são utilizadas no tratamento de diarreias, enquanto as flores e brotos são recomendadas para dores de estômago, doenças de pele e disenteria sanguinolenta (Gnan & Demello, 1999).



FIGURA 1. *Psidium guajava* L.

Lozoya et al. (1990) pesquisaram os princípios ativos das folhas de *P. guajava* L. e isolaram três flavonóides com atividade antibacteriana; a quercetina, a guajaverina e a avicularina.

Lutterodt (1989), estudando a espécie *P. guajava* L. verificou que dentre as inúmeras substâncias com propriedades adstringentes, a quercetina foi a que apresentou maior atividade antidiarréica.

Contudo, popularmente, a espécie *P. guajava* L. é a mais utilizada na forma de chá, no tratamento de diversas afecções. O estudo farmacológico de seu extrato aquoso demonstrou a presença de atividade espasmolítica (Lutterodt, 1989; Lozoya et al., 1990; Cáceres et al., 1993; Morales, 1994; Olajide et al., 1999), atividade analgésica (Olajide et al., 1999), atividade anti-amebiana (Tona et al., 1998), atividade narcótica (Lutterodt, 1992) e atividade antiinflamatória e antipirética (Olajide et al., 1999).

De acordo com Martínez et al. (1997), numerosos estudos farmacológicos e toxicológicos têm sido realizados com a goiabeira. Os autores investigaram a atividade antibacteriana nos extratos aquosos, salinos e hidroalcoólicos de suas folhas em relação à *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Thyphi*, *Sarcina lútea* e *Nisseria gonorrhoea*, e nos extratos metanólico, acetônicos e n-hexânicos frente a *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *S. pyogenes*.

Diversos estudos são reportados na investigação da eficiência da atividade antimicrobiana de folhas de goiabeira, sobre diversas famílias bacterianas, tais como enterobacteriaceae, vibrionaceae, micrococaceae e alguns vírus (Aguiar et al., 1984; Gnan & Demello, 1999; Jaiarj et al., 1999; Vieira et al., 2001).

Martínez et al. (1997) constaram que o extrato aquoso de *P. guajava* L. possui atividade tuberculostática exibindo ação contra *Mycobacterium phlei*. O fruto possui atividade antiespasmódica, as folhas efeito antilipolíticos e tanto o fruto como as folhas são hipoglicemiantes.

Rodríguez et al. (1999), em seus estudos com tintura de folhas de goiabeira a 20%, comprovaram atividade farmacológica *in vivo*, observando a diminuição do trânsito intestinal em ratos.

Para Direkbusakaram et al. (1997), a *P. guajava* L. pode ser utilizada no tratamento de doenças bacterianas e viróticas em animais aquáticos, tais como camarões e peixes. Na aquicultura, essas doenças geram grandes perdas econômicas para os produtores, devido aos elevados índices de mortalidade.

Gnan & Demello (1999) estudaram três plantas medicinais brasileiras comparando-as com antibióticos comerciais e concluíram, que dentre elas, as folhas da goiabeira possuem boa atividade antibacteriana contra *S. aureus*.

As folhas, raízes e flores de *P. guajava* L. são freqüentemente usadas em regiões tropicais e subtropicais para o tratamento de diarreia, inibindo o crescimento de *E. coli*, *Salmonella* Enteritides e *Shigella flexneri*, sendo a atividade antibiótica atribuída aos compostos guajaverina e ácido psidiólico (Almeida et al., 1995).

Ahmad & Beg (2001) estudaram as propriedades fitoquímicas e antimicrobianas do extrato alcoólico de *P. guajava* L. e detectaram a presença de glicosídeo, fenol, tanino e saponina com atividade positiva contra *S. aureus*.

Holetz et al. (2002) pesquisaram algumas plantas usadas na medicina popular para o tratamento de doenças infecciosas e reportaram a atividade antimicrobiana moderada do extrato de *P. guajava* L. contra *S. aureus* e *E. coli*.

Vieira et al. (2001) testaram duas plantas medicinais, *P. guajava* L. e *Carica papaya* L., contra às bactérias *E.coli* e *S. aureus*, para verificar suas ações antibióticas. Os extratos de *C. papaya* L. não revelaram qualquer atividade antibiótica, enquanto os extratos de *P. guajava* L. mostraram inibição de crescimento para as duas espécies.

Outras espécies do gênero *Psidium* também são utilizadas no alívio de dores digestivas, como antiulcerativas e na assepsia dos olhos, como é o caso da *P. luridum* L. (Olano et al., 1996).

Dentre as famílias que concentram seus elementos voláteis nas folhas destaca-se a família Myrtaceae, que contém aproximadamente 3.500 espécies distribuídas por todo o mundo (Joly, 1979).

As folhas de *P. guajava* L. contêm óleo essencial rico em cineol, taninos e triterpenos (Olajide, 1999).

Segundo Corrêa (1984), as folhas de *P. guajava* L., enquanto frescas, fornecem óleo essencial aromático e volátil com coloração amarelo-esverdeada.

2.4 Alfavaca, *Ocimum gratissimum* L.

Planta medicinal da família das Lamiaceae, originária da África e Ásia, introduzida no Brasil pelos imigrantes italianos, a alfavaca (Figura 2) é largamente distribuída nas regiões tropical e subtropical, sendo comumente usada na medicina popular e no tratamento de diferentes doenças como infecções do trato respiratório, diarreia, dor de cabeça, febre, tosse e conjuntivite (Nakamura et al., 1999; Holetz et al., 2002).

Entre os diversos tipos dessa planta estão os membros do gênero *Ocimum*, que é representado por seis espécies. Contudo, somente três espécies, *O. gratissimum* L., *O. basilicum* e *O. canum*, têm sido relatadas com propriedades medicinais (Nakamura et al., 1999).

Na Nigéria, *O. gratissimum* L. é uma planta muito cultivada para fins medicinais e como aromatizante de alimentos. Alguns estudiosos citam as propriedades antimicrobianas, atividades antimutagênicas, efeitos antidiarréicos e imunomodulantes (Offiah & Chikwendu, 1999).

Estudo fitoquímico realizado com *O. gratissimum* L. evidenciou a presença de aminas, esteróides, triterpenóides, fenóis, flavonóides, açúcares redutores, óleo essencial, saponinas e quinonas (Garcia et al., 1998).

De acordo com Montalvo & Dominguez (1997), do ponto de vista toxicológico, *O. gratissimum* L. tem mostrado que doses excessivas podem provocar irritações gastrintestinais e convulsões.

A atividade antimicrobiana do óleo essencial da parte aérea da planta *O. gratissimum* L. tem sido muito estudada frente diversas espécies de bactérias e fungos (Orafidiya et al., 2001).

De acordo com Cimanga et al. (2002), alguns compostos químicos foram identificados no óleo essencial extraído das folhas de *O. gratissimum* L. São eles:

pineno, β -pineno, mircenol, limoneno, 1,8-cineol, γ -terpineno, *p*-cimeno, -terpineol, carvacrol, eugenol, -eudesmol.

Sinhá & Gulati (1990) relataram que as atividades antimicrobianas dos óleos essenciais de diferentes espécies do gênero *Ocimum* estão, predominantemente, associadas aos principais constituintes do linalol e metil chavicol.



FIGURA 2. *Ocimum gratissimum* L.

As propriedades antidiarréicas do óleo essencial e do extrato aquoso das folhas de *O. gratissimum* L. também têm sido mostradas em pesquisas com animais (Offiah & Chikwendu, 1999; Orafidiya et al., 2000).

Batista et al. (2001) avaliaram a atividade inseticida do óleo essencial de *O. gratissimum* L. e concluíram que ele possui uma ação tóxica para a larva da lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*) e o indicam como agente de controle para este inseto.

Recentemente, Nakamura et al. (1999) relataram a atividade antibacteriana do óleo essencial de *O. gratissimum* L., tradicionalmente utilizado na medicina folclórica brasileira, para o tratamento de diferentes doenças.

2.5 Gengibre, *Zingiber officinale* Roscoe

O gengibre (Figura 3) é uma planta herbácea pertencente à família Zingiberaceae, nativa do sudoeste da Ásia e de outros climas tropicais. O inglês Willian Roscoe (1753-1831) deu o nome *Zingiber officinale* Roscoe à planta, que foi introduzida no Brasil pelos holandeses no século XVI e exportada para toda a Europa. Historicamente, o gengibre teria sido usado para ajudar na digestão dos alimentos. Atualmente vários estudos têm sido publicados relatando os seus efeitos medicinais (Crawford, 2002).

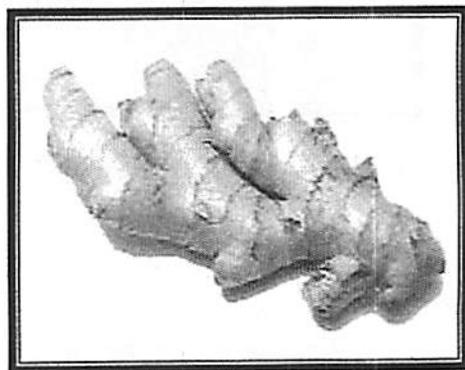


FIGURA 3. *Zingiber officinale* Roscoe

A raiz da planta, além de ser usada como condimento de alimentos, tem sido utilizada extensivamente na medicina por várias culturas. Na Antigüidade,

tanto os gregos como os romanos já a utilizavam e, hoje em dia, uma de suas aplicações é no controle de dores de estômago e náuseas (DrMundi, 2003).

Os japoneses usam o gengibre como antídoto em intoxicação alimentar, especialmente no preparo do *sushi* para evitar danos causados por bactérias intestinais, como *E. coli*, *Staphylococcus* e *Streptococcus*, contudo, sem eliminar as bactérias benéficas. Tem sido citada também sua ação no crescimento de *Lactobacillus* no intestino, bem como a ação parasiticida sobre *Schistosoma* e *Anisaki* (Crawford, 2002).

Srinivasan et al. (2001) estudaram extrato de *Zingiber officinale* R. e constataram que o mesmo apresentava atividade antibacteriana frente às seguintes bactérias patogênicas: *Chromobacterium violaceum*, *E. coli*, *Enterobacter faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. Paratyphi*, *S. Typhi*, *Bacillus subtilis* e *S. aureus*.

Em São Tomé, o óleo essencial das plantas é largamente usado. Nesse país, rizomas de *Zingiber officinale* Roscoe são muito populares e usados na medicina contra distúrbios gastrintestinal, febres, gripes e como afrodisíaco (Martins et al., 2001).

A maioria das atividades farmacológicas encontradas nos extratos da planta é isolada dos rizomas e algumas frações de seus princípios ativos são: citral, 1,8-cineol, zingibereno, bisaboleno, geraniol, acetato de geranila, gingeróis, chugaois, zingiberol, canfeno, felandreno, borneol, linalol, acetatos e caprilatos de zingiberol, aldeídos e cetonas. O extrato de 6-gingerol possui atividade contra às larvas *Anisaki* e *Shistosoma mansoni* (Alejo et al., 1999).

Smith-Palmer et al. (1998) pesquisaram as propriedades antimicrobianas de 21 óleos essenciais e duas essências frente a cinco bactérias patogênicas de origem alimentar. O óleo de *Zingiber officinale* R., nesse estudo, apresentou

fraca atividade para as cepas de *E. coli*, *S. aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis e *Campylobacter jejuni*.

Também, Hammer et al. (1999) estudaram diversos óleos essenciais e extratos de planta contra bactérias gram-positivas e gram-negativas e leveduras, mas a atividade antibacteriana do óleo de *Zingiber officinale* R. foi comprovada somente, para *S. aureus*. Os autores compararam seus resultados com outros publicados e citaram que a composição desses óleos e extratos pode variar de acordo com o local, clima, condições ambientais e métodos usados.

Martins et al. (2001) identificaram, em duas amostras de óleo essencial de *Zingiber officinale* R., -zingiberene, bisabolene, -curcumene, neral, geranial e mostraram que estes compostos possuem atividades antimicrobianas frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas, leveduras e fungos filamentosos.

2.6 Pimenta dióica, *Pimenta dioica* Lindl

Esta espécie vegetal, conhecida popularmente como pimenta-da-jamaica, pertence à família Myrtaceae, com aproximadamente 140 gêneros e 3.000 espécies distribuídas nas regiões tropicais, subtropicais e Austrália (Allspice, 2002).

Segundo Corrêa (1984), a *Pimenta dioica* L. (Figura 4) é uma árvore fortemente aromática em todas as suas partes.

Na civilização antiga, a *Pimenta dioica* L. foi usada principalmente para embalsamento. Atualmente é usada como conservante de carnes e em pickles, especialmente na Escandinávia (Allspice, 2003).

Na Jamaica, é usada na culinária como temperos de sopas, guisados, pickles, chás, bolos, biscoitos, pastéis e produtos alimentares usados em ketchups, salsichas e sanduíches. Também é utilizada na produção da bebidas “pimento

dram”, obtida dos frutos. Nas Bahamas, produz-se um chá muito agradável obtido das folhas. (Duke, 1985).



FIGURA 4. *Pimenta dioica* Lindl

Esta espécie vegetal tem larga aplicação medicinal em vários países, dentre os quais a Jamaica, onde os frutos são utilizados no tratamento de resfriados, hemorragias e estomatites. Na Costa Rica, as folhas são usadas como carminativo e estomáquico, além de serem excelentes para diabetes. Na Guatemala, aplica-se externamente em escoriações e dores reumáticas. Em Cuba é utilizada como bebida refrescante, chá depurativo e estimulante tônico. O óleo essencial do fruto é usado no tratamento de diarreia, dispepsia e flatulência (Duke, 1985).

No Brasil, a *Pimenta dioica* L. é conhecida como: pimenta-da-jamaica, pimenta-de-coroa e murta-pimenta (Corrêa, 1984; Barroso, 1991).

Segundo Guenther (1950), existem dois tipos de óleos de pimenta no mercado: o óleo destilado dos frutos, com fino odor e sabor, característico de

pimenta (desta forma tem alto preço) e o óleo obtido das folhas, o qual apresenta qualidade inferior.

O fruto seco contém de 2% a 5% de óleo essencial; sendo que a quantidade do óleo no fruto depende do período de colheita. O pó contém eugenol (65% a 85%), éter metil eugenol, cariofileno, felandreno, cineol, ácido palmítico, óleos fixos, resinas, açúcares, amido, ácido málico, oxalato de cálcio e taninos (Duke, 1985).

O eugenol, por sua vez, é um composto aromático muito usado como flavorizante (Craveiro et al., 1981), como antioxidante (Costa, 1994), antialérgico (Kin, 1996), antiespasmódico (Myinte, 1996), anti-séptico, agente antimicrobiano, antiinflamatório (Kobaysahi, 1997), e como atrativo de insetos (Rebêlo, 2001).

Segundo Mouchrek Filho et al. (2000) alguns produtos obtidos por sínteses químicas, a partir do eugenol, tais como; metil eugenol e acetato de eugenila, adquiriram um elevado valor comercial, devido as utilizações de seus princípios ativos nas indústrias agroquímicas, substituindo os atuais defensivos agrícolas, como atrativos de insetos (feromônios) e ainda nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos.

Rodríguez et al. (1996) avaliaram a atividade biológica do óleo essencial da *Pimenta dioica* L. frente a bactérias gram-positiva, negativas e fungos. Os resultados mostraram maior eficiência para os fungos, sendo o componente majoritário do óleo essencial o eugenol (54,3%).

De acordo com Rodríguez et al. (1997), o óleo essencial da *Pimenta dioica* L. é muito usado na medicina popular e tem sido utilizado na forma de infusões para dores abdominais, também com propriedades afrodisíacas, diarréicas, laxativas e estimulantes.

López et al. (1998) estudaram o extrato da *Pimenta dioica* L. e comprovaram seus efeitos analgésico e antipirético. O eugenol encontrado em grandes quantidades nas folhas da planta pode ser o responsável por estas atividades.

2.7 Pau-rosa, *Aniba duckei* Kostermans

A *Aniba duckei* Kostermans, conhecida popularmente como pau-rosa (Figura 5), é uma espécie florestal nativa da região amazônica, pertencente à família Lauraceae, ocorrendo nas florestas tropicais úmidas (Vieira, 1979; Magalhães & Alencar, 1979).

A exploração do pau-rosa para a extração de seu óleo essencial tem sido realizada desde 1911 (Azeredo, 1958), desempenhando uma importante função econômica da região amazônica devido à alta concentração de linalol na constituição química do óleo. A exploração desenvolveu-se, entretanto, de forma rápida e desordenadamente a partir de 1920. Na década de 40 este produto ocupou o terceiro lugar na pauta de exportações da Amazônia e atualmente menos de 15% do óleo de pau-rosa é industrializado no Brasil, sendo o restante exportado para os Estados Unidos, Japão e Europa (Mitja et al, 1996).

Segundo Mitja et al (1996) o óleo essencial da espécie *Aniba duckei* K. é extremamente importante em várias comunidades da Região Amazônica pelo fato de ser principalmente uma fonte geradora de renda, o que é de grande interesse nacional. É normalmente usado por populações locais para tratamento de doenças reumáticas e de outras naturezas. Na indústria cosmética é muito utilizado, principalmente na produção de perfumes.

O linalol é o constituinte majoritário do óleo da *Aniba duckei* K., embora outros componentes também façam parte de sua composição, tais como α -

terpineol, 1,8-cineol e α -pineno (Lawrence & Reynolds, 1984). Seu princípio ativo tem sido testado como bactericida, fungicida (Belaiche et al., 1995) e acaricida (Prates et al., 1998). Na medicina, tem sido aplicado, com sucesso, como sedativo (Sugawara et al., 1998; Elisabetsky et al., 1999) e atualmente estão sendo analisadas as suas propriedades anticonvulsivas (Elisabetsky et al., 1999). Assim, o linalol possui uma larga aplicação em várias áreas do conhecimento humano.



FIGURA 5. *Aniba duckei* Kostermans

2.8 Importância do pescado como veículo nas doenças transmitidas por alimentos (DTA)

O termo “pescado” se refere a todas as espécies comestíveis de água doce e marinha, compreendendo os peixes, crustáceos, moluscos, anfíbios e

quelônios. A variedade de produtos derivados do pescado é muito ampla e inclui alimentos preparados por vários métodos tecnológicos tradicionais e modernos (ICMSF, 1998).

Como os pescados são de grande importância para a nutrição humana mundial, muitos países os utilizam na sua dieta como fonte principal de proteínas (Feldhusen, 2000; Jaksic et al., 2002). Contêm de 15% a 20% de proteínas de alto valor biológico, uma vez que estas possuem todos os aminoácidos essenciais, especialmente lisina (Adams & Moss, 2002).

A carne do pescado é um excelente substrato para o crescimento da maioria das bactérias heterotróficas. De acordo com Jay (2000), as bactérias responsáveis pela deterioração do pescado são, principalmente, as gram-negativas, tais como as *Pseudomonas*, capazes de crescer a menos de 3°C.

Segundo Vieira (1989), a microbiota do pescado é tanto mais rica em espécies microbianas quanto mais poluídas forem as águas das quais advém. Outro ponto importante a ser considerado é a espécie do pescado, pois sua composição química também determinará a predominância de diferentes espécies de microrganismo.

A temperatura da água é outro fator significativo no número e espécie de bactérias na superfície do pescado e, para Feldhusen (2000), a carga microbiana do pescado após a captura está relacionada às condições ambientais, qualidade microbiológica da água, temperatura, teor residual de sal, distância entre a localização da captura e áreas poluídas com dejetos humanos e animais, origem dos alimentos consumidos pelo pescado e suas condições de resfriamento.

As bactérias patogênicas associadas a pescados são caracterizadas em três grupos: as que normalmente estão presente em ambientes marinhos e estuarinos (bactérias do gênero *Vibrio*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* e *Aeromonas hydrophila*), as enterobactérias (devido a contaminação

TRACAR

fecal) e bactérias que contaminam o produto durante o processamento (Jaksic et al., 2002).

Assim, os pescados podem ser contaminados por várias bactérias patogênicas, normalmente encontradas em ambientes aquáticos (Feldhusen, 2000).

Segundo Jaksic et al. (2002), há poucos dados registrados na literatura sobre intoxicações alimentares e citam o pescado como o alimento mais envolvido.

2.8.1 Sururu, *Mytella falcata* d'Orbigny

Os moluscos são animais invertebrados com corpo não segmentado, mole, geralmente envolvido em conchas que podem ser interna e externa. Quando externas, chamam-se valvas e é exatamente devido a esta característica que são denominados moluscos bivalves (Davey, 2001).

O sururu é um molusco bivalve, comestível, com concha de aproximadamente 8 cm, encontrado com muita freqüência no litoral do Nordeste brasileiro. No estado do Maranhão tem uma ocorrência bastante significativa e os mais capturados em sua costa compreendem principalmente duas espécies: sururu-de-pasta (*Mytella falcata* d'Orbigny) e sururu-de-dedo (*Mytella guyanensis*).

O consumo de moluscos bivalves está freqüentemente associado a elevado número de doenças de origem alimentar em função de suas propriedades filtradoras e, conseqüentemente, bioacumuladores de microrganismos. Têm seu *habitat* em estuários e áreas costeiras, tomando-se especialmente perigosos para o consumo humano; por essas características são excelentes indicadores de poluição (Martinez-Urtaza et al., 2003).

quelônios. A variedade de produtos derivados do pescado é muito ampla e inclui alimentos preparados por vários métodos tecnológicos tradicionais e modernos (ICMSF, 1998).

Como os pescados são de grande importância para a nutrição humana mundial, muitos países os utilizam na sua dieta como fonte principal de proteínas (Feldhusen, 2000; Jaksic et al., 2002). Contêm de 15% a 20% de proteínas de alto valor biológico, uma vez que estas possuem todos os aminoácidos essenciais, especialmente lisina (Adams & Moss, 2002).

A carne do pescado é um excelente substrato para o crescimento da maioria das bactérias heterotróficas. De acordo com Jay (2000), as bactérias responsáveis pela deterioração do pescado são, principalmente, as gram-negativas, tais como as *Pseudomonas*, capazes de crescer a menos de 3°C.

Segundo Vieira (1989), a microbiota do pescado é tanto mais rica em espécies microbianas quanto mais poluídas forem as águas das quais advém. Outro ponto importante a ser considerado é a espécie do pescado, pois sua composição química também determinará a predominância de diferentes espécies de microrganismo.

A temperatura da água é outro fator significativo no número e espécie de bactérias na superfície do pescado e, para Feldhusen (2000), a carga microbiana do pescado após a captura está relacionada às condições ambientais, qualidade microbiológica da água, temperatura, teor residual de sal, distância entre a localização da captura e áreas poluídas com dejetos humanos e animais, origem dos alimentos consumidos pelo pescado e suas condições de resfriamento.

As bactérias patogênicas associadas a pescados são caracterizadas em três grupos: as que normalmente estão presente em ambientes marinhos e estuarinos (bactérias do gênero *Vibrio*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* e *Aeromonas hydrophila*), as enterobactérias (devido a contaminação

Segundo Sheehan & Power (1999), os sururus possuem inúmeras propriedades que os fazem úteis: são estacionários e normalmente é a espécie dominante do seu hábitat. Além disso, resistem a elevados níveis de poluição e são abundantes em estuários, o que os torna muito próximos do homem.

Os moluscos são normalmente transportados vivos para o ponto de venda ou processamento, onde a carne é removida, freqüentemente, manualmente. Embora a contaminação possa acontecer nesta fase, os problemas significativos de saúde pública, associados com moluscos, surgem mais da habilidade deles em concentrar vírus e bactérias das águas poluídas com esgotos e da prática do consumo desses moluscos crus ou mal cozidos (Adams & Moss, 2002).

Segundo Vieira (1989), o grau de perigo da ingestão desse alimento decorre do seu consumo *in natura*, sem nenhum cozimento prévio. Nesse caso, o risco de DTAs aumenta por não se saber quais bactérias e quais níveis quantitativos estariam presentes no animal. Além do mais, certas microalgas, quando ingeridas pelos moluscos, os tornam potencialmente perigosos, dada a sua extrema toxicidade, podendo causar, inclusive, a morte de quem consumi-los como alimento.

A poluição microbiana das águas onde são capturados os moluscos é um problema muito comum nas costas dos países desenvolvidos. Efluentes domésticos, quando introduzidos no ambiente, podem prejudicar o hábitat dos moluscos, principalmente porque o animal sendo consumido cru há o risco de transmissão de doenças. (Manzanares et al., 1992). O autor relata que os surtos decorrentes do consumo de moluscos contaminados têm sido notificados em vários países.

Pertencentes à família Vibrionaceae, o *Vibrio alginolyticus*, *V. cholerae* não O1, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* estão entre os principais patógenos

autóctones encontrados em ambientes marinhos, principalmente quando a temperatura da água é elevada (ICMSF, 1998; Croci et al., 2002).

Segundo Cook et al. (2002) o *V. parahaemolyticus* foi identificado como a principal causa de infecção de origem alimentar relacionada com o consumo de alimentos marinhos, sendo os surtos registrados principalmente pelo consumo de ostras e sururus crus ou parcialmente cozidos. Os autores enfatizam ainda que o aumento da frequência de surtos e o número de casos têm estimulado os órgãos de saúde pública a buscarem métodos de controle para prevenir a transmissão das doenças causadas pela bactéria de distribuição sazonal e geográfica.

No ano de 1990, Archer & Moretto (1994) isolaram *V. parahaemolyticus* em quarenta amostras de mexilhões comercializados no município de Palhoça, Santa Catarina.

Pesquisas comprovaram que um microrganismo especialmente perigoso para os indivíduos infectados com o vírus da síndrome da imunodeficiência adquirida (doença conhecida em inglês pela sigla AIDS), com alterações hepáticas (cirrose) e outras doenças como o diabetes, é o *Vibrio vulnificus*. Esta bactéria pode ocasionar uma septicemia primária fulminante que pode levar à morte (ICMSF, 1998). Os casos se devem, principalmente, ao consumo de moluscos crus, contaminados por esse microrganismo.

Nos Estados Unidos, entre os anos de 1997 e 1998, foram notificados quatro surtos de *V. parahaemolyticus* envolvendo 600 indivíduos (Cook et al., 2002).

Jaksic et al. (2002) enfatizaram que os vibrios são facilmente destruídos pelo calor, portanto, o cozimento adequado é suficiente para a sua eliminação.

Encontradas na água e também causadoras de enfermidades devido ao consumo de moluscos são as *Plesiomonas shigelloides* e *Aeromonas hydrophila*, mas a origem dos surtos ainda não está bem esclarecida (ICMSF, 1998).

Segundo Griffin et al. (1980) e Abeyta et al. (1993), *Campylobacter jejuni* tem sido recentemente implicado em surtos de gastroenterites relacionados também com o consumo de molusco.

Outro microrganismo implicado em surtos é *Staphylococcus aureus*, isolado a partir de uma grande percentagem de amostra de carne de marisco, provavelmente devido à sua manipulação durante o desconchamento (Ayulo et al., 1994).

Segundo Vantarakis et al. (2000), *Salmonella* spp compreende um dos grupos de patógenos mais importantes de doenças de origem alimentar em todo o mundo. As gastroenterites causadas por essa bactéria também estão associadas ao consumo de mariscos contaminados, particularmente ostras e sururus crus.

De acordo com Martinez-Urtaza et al. (2003) *Salmonella* spp pode ser detectada em ambientes aquáticos onde sobrevivem por mais de quatro semanas.

Já Romalde (2002) relatou que surtos de enfermidades associadas a vírus entéricos devido ao consumo de moluscos constituem um importante perigo para a saúde pública em âmbito mundial, destacando-se, principalmente, os vírus tipo norwalk, rotavírus, astrovírus e o vírus da hepatite A.

Segundo Hood et al. (1983), os coliformes fecais são usados como indicadores da qualidade dos mariscos bem como para classificar as águas onde eles são capturados.

2.9 Patógenos em moluscos bivalves

2.9.1 *Salmonella*

Willian Budd, em 1874, foi o primeiro cientista a documentar a febre tifóide. Em seguida, o agente da enfermidade foi descoberto em 1880 por Eberth e isolado em 1884 por Graffky. Salmon e Smith, em 1885, isolaram *Bacillus Cholerae-suis*, atualmente de *Salmonella enterica* sorovar Choleraesuis. O gênero *Salmonella* foi finalmente batizado por Ligniers (1900) em homenagem a Salmon (ICMSF, 1996; D'Aoust, 2001; Adams & Moss, 2002).

Existem 2.501 sorotipos de salmonelas, dentre os quais 1.478 pertencem à subespécie I, incluindo *Salmonella* sorotipo Typhi (Popoff et al., 2001). Mudanças significativas ocorreram na nomenclatura e taxonomia das salmonelas nos últimos anos, baseadas, principalmente, nas suas características bioquímicas. Segundo Campos (1999) o gênero *Salmonella* está dividido em duas espécies *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*, sendo a primeira subdividida em seis subespécies.

Essas enterobactérias são transmitidas ao homem principalmente, por meio de consumo de alimentos contaminados por fezes de animais ou humanas (Pac Sá, 1998).

Salmonella encontra-se largamente distribuída em ambiente natural, na agricultura com intensivas práticas, nas indústrias de carne, peixes e moluscos. Os alimentos, especialmente os de origem animal, que estão expostos à contaminação de águas residuais, têm sido identificados como veículo potencial desses patógenos na cadeia global dos alimentos (ICMSF, 1996; D'Aoust, 2001).

Salmonella é um dos microrganismos mais freqüentemente envolvidos em casos e surtos de doença de origem alimentar em diversos países, inclusive

no Brasil. Na Inglaterra e países vizinhos, 90% dos casos de DTAs são causados por *Salmonella*. Dados publicados nos Estados Unidos, Canadá e Japão indicam que a ocorrência de salmonelose de origem alimentar aumenta a cada ano (Franco & Landgraf, 1996).

Nos Estados Unidos são estimados anualmente 800.000 a 4 milhões de casos de *Salmonella* resultando em 500 óbitos (Peña et al., 2001), sendo as crianças o grupo que mais freqüentemente contrai a bactéria (CDC, 1999).

Morales & Thurman (1993), relataram que a salmonelose está entre as dez causas de doenças de origem alimentar mais freqüentemente notificadas em humanos nos Estados Unidos, com taxa média anual de 4.500 casos, sendo observada uma evolução crescente nas taxas de isolamento da bactéria pelos Centros de Controle de Doenças (CDC, 1999).

De acordo com Peresi et al. (1998), nos Estados Unidos são estimados, por ano, 6,5 milhões de casos de infecções e 9.000 mil óbitos em consequência de enfermidades transmitidas por alimentos.

No Brasil, a região noroeste do estado de São Paulo, desde 1993, tem sido reportada como uma das áreas de maior ocorrência de surto de salmonelose de veiculação alimentar. Carne de frangos e ovos consumidos por todas as classes sociais têm sido associadas aos numerosos casos de infecções humanas por *Salmonella* (Peresi et al., 1998).

Outros alimentos, tais como carne de boi, peixes, mariscos, sorvetes e chocolates também têm sido implicados em surtos (Duffy et al., 1999).

Segundo Cogco et al. (2000), a salmonelose é uma enfermidade aguda de distribuição mundial, com variações de sorotipos de um país para outro e que afeta todas as faixas etárias, com maior incidência em menores de cinco anos e maiores de sessenta anos, que são os grupos mais vulneráveis.

Investigações de surtos de origem alimentar têm mostrado que a ingestão mesmo reduzida de células de *Salmonella* pode ser infectante. Pesquisas recentes sugerem que 1 a 10 células podem constituir uma dose infectante para o homem (D'Aoust, 2001).

As primeiras investigações indicaram que, para causar enfermidades em adultos, o alimento ingerido teria que ter uma concentração mínima de 10^7 UFC g⁻¹. Entretanto, em investigações de alguns surtos, especialmente quando o veículo era água ou alimentos gordurosos ou tamponados, foram encontradas doses inferiores a 10 UFC/g de *Salmonella* consideradas como infectantes (ICMSF, 1998; Jay, 2000).

A contaminação do alimento ocorre devido ao controle inadequado de temperatura, de práticas de manipulação ou por contaminação cruzada de alimentos crus com alimentos processados. O microrganismo se multiplica no alimento, atingindo então a dose infectante (Jay, 2000; Forsythe, 2002).

2.9.2 *Escherichia coli*

A importância da *Escherichia coli* como patógeno humano tem sido reconhecida desde seu descobrimento, em 1885, pelo Dr. Theodor Escherich. Está relacionada com casos de diarreias, principalmente infantil, com colites hemorrágicas (HC), disenterias, infecções da bexiga, dos rins, infecções de feridas cirúrgicas, septicemia, síndrome urêmico-hemolítica (HUS), pneumonia e com meningite. Algumas destas enfermidades terminam em óbitos (ICMSF, 1998; Bell & Kyriakides, 2000).

O habitat da *E. coli* é o trato intestinal de humanos e animais. Muitas cepas da bactéria são inofensivas, contudo, algumas são patogênicas e causam doenças diarreicas (ICMSF, 1998; Doyle et al., 2001).

Atualmente, seis tipos principais de *E. coli* são classificados em grupos específicos baseados nos fatores de virulência, mecanismos de patogenicidade, síndrome clínica e distintos sorotipos O:H. Essas categorias são *E. coli* enteropatogênica (EPEC), enterotoxigênicas (ETEC), enteroinvasiva (EIEC), difuso aderente (DAEC), enteroagregativa (EAEC) e entero-hemorrágica (EHEC) (Bell & Kyriakides, 2000; Jay, 2000; Doyle et al., 2001; Adams & Moss, 2002).

Recentemente, a importância da *E. coli* foi relacionada com a presença de cepas produtoras de citotoxina Vero (VTEC), do sorotipo O157:H7 que tem ocasionado surtos de toxinfecções alimentares com morbidade e mortalidade (Bell & Kyriakides, 2000; Adams & Moss, 2002).

O primeiro surto foi documentado em Michigan, nos Estados Unidos, em 1982. Foram relatados 47 casos de colite hemorrágica e gastrinterites, associados com o consumo de carne servida por uma cadeia de restaurantes (ICMSF, 1998; McIngvale et al., 2000).

A *E. coli* O157:H7 é uma cepa entero-hemorrágica (EHEC) implicada em surtos de DTAs, quando se ingerem alimentos mal cozidos e por transmissão de pessoa a pessoa (Diaz & Hotchkiss, 1996).

Para Tarr et al. (1999), as infecções causadas por *E. coli* O157:H7 são muito graves e um baixo número de células pode causar doenças no homem. Vários alimentos já foram considerados potencialmente perigosos quando manipulados inadequadamente. Os idosos, gestantes, crianças e indivíduos imunodeprimidos fazem parte da população de maior risco (McIngvale et al., 2000).

Segundo Bell & Kyriakides (2000) os principais sintomas da enfermidade são dores abdominais, diarreia sanguinolenta e edema da mucosa

do cólon, após um a dois dias de incubação. A enfermidade dura aproximadamente oito dias.

Como a contaminação dos alimentos ocorre principalmente por contato com material fecal de animais contaminados ou com o contato de superfícies mal higienizadas, qualquer produto alimentício pode veicular essa bactéria. Os alimentos mais incriminados nos surtos são: carne bovina mal cozida, em especial a carne moída, muito utilizada na preparação de hambúrgueres; leite cru e produtos lácteos fermentados, vegetais consumidos crus, molhos para saladas, maioneses, cidra, suco de maçã não pasteurizado, água não clorada e pescado (Palumbo et al., 1995; McIngvale et al., 2000).

Estudos realizados por Palumbo et al. (1995) mostraram que o conhecimento do mínimo e do máximo de temperatura para o crescimento de *E. coli* é muito importante para a preservação dos alimentos e na detecção dessa bactéria.

E. coli ainda é muito utilizada como indicador de contaminação fecal dos alimentos e água. Contudo, para a indústria de alimentos, as provas específicas para a detecção de VTEC, especificamente o sorotipo O157:H7 nos alimentos, têm sido parte dos procedimentos mais eficazes para o controle da inocuidade dos mesmos (Bell & Kyriakides, 2000).

São poucos os dados sobre surtos de *E. coli* (EPEC, ETEC e EIEC) nos alimentos, em grande parte devido à falta de provas laboratoriais (ICMSF, 1996).

A *E. coli* geralmente sobrevive bem nos alimentos à temperatura de refrigeração (37°C-7°C).

2.9.3 *Staphylococcus aureus*

A espécie *Staphylococcus aureus* é um microrganismo muito conhecido pela sua patogenicidade ao homem e outros animais. Foi estudada pela primeira vez por Denys em 1894 e, posteriormente, por Barber, em 1914. Somente em 1930 foi definitivamente reconhecida a importância dos estafilococos na intoxicação alimentar (Jay, 2000).

O gênero *Staphylococcus* possui mais de trinta espécies. A produção de enterotoxina está associada principalmente à espécie *S. aureus*, embora outras espécies como *S. intermedius* e *S. hyicus*, também tenham sido reconhecidas como produtoras (Jay, 2000; Adams & Moss, 2002).

Existem cerca de 34 diferentes tipos de proteínas extracelulares que podem ser produzidas por estafilococos e muitas delas estão envolvidas ou contribuem para o processo de patogenicidade e virulência do microrganismo (Iandolo, 1989).

As enterotoxinas estafilocócicas (Staphylococcal Enterotoxins-SE) são caracterizadas com base nas suas reações imunológicas. Já foram identificadas as toxinas tipo A, B, C₁, C₂, C₃, D, E, G e H (Soares et al., 1997). As enterotoxinas são designadas por SE, acrescido do tipo da toxina (Ex. SEA, SEC etc).

Segundo Oliveira & Hirooka (1996), cerca de 5% das intoxicações são causadas por enterotoxinas ainda não identificadas.

As enterotoxinas estafilocócicas (Ess) pertencem a uma grande família de exotoxinas pirogênicas (EP) estafilocócicas e estreptocócicas, compartilhando relações filogenéticas, estrutura, função e homologia de sequências comuns. Essas toxinas causam síndrome similar ao choque tóxico e têm sido implicadas em envenenamento alimentar e várias doenças alérgicas e imunomediadas.

Incluídas dentro desse grupo estão as endotoxinas estafilocócicas, duas formas de toxinas da síndrome do choque tóxico (TSST) e um grupo de exotoxinas pirogênicas estreptocócicas (Balaban & Rasooly, 2000).

O *S. aureus* é um dos agentes patogênicos mais comuns, responsável por severas infecções em humanos. Está amplamente distribuído na natureza e os humanos e os animais são seus principais reservatórios (Iaria et al., 1980).

As enterotoxinas são detectáveis com um inóculo baixo de 10^3 UFC/g (Meyrand, 1998) e as principais fontes de contaminação dos alimentos são seus manipuladores (Jay, 2000).

Gastrenterite estafilocócica é causada pela ingestão de alimentos contaminados com toxinas produzidas por algumas espécies de *Staphylococcus coagulase positiva* (Jay, 2000), embora algumas cepas de *Staphylococcus coagulase negativa* possam também produzir enterotoxinas.

Números baixos de *S. aureus* nos alimentos não representam importância para a saúde pública, no entanto, se o crescimento for maior ou igual a 10^6 UFC por grama do alimento já se admite um número de células capazes de produzir toxinas em quantidade suficiente para causar intoxicação no homem (Bergdoll, 1990; Baird & Lee, 1995).

Diversos alimentos, especialmente os de origem animal, são frequentemente incriminados nas gastrenterites estafilocócicas, como as carnes de aves cozidas, peixes, especialmente os crustáceos e moluscos, ou aqueles que são manuseados excessivamente (Ayulo et al., 1994; Baird & Lee, 1995).

A intoxicação estafilocócica é caracterizada por náusea, vômito, dores abdominais, diarreia e dores de cabeça. O início dos sintomas é normalmente rápido, dependendo da susceptibilidade individual à toxina, da quantidade de alimento contaminado ingerido e da quantidade de toxina no alimento ingerido (Forsythe, 2002).

Forsythe (2002) ressalta que o *S. aureus* não é bom competidor com outras bactérias, portanto, raramente pode causar intoxicação alimentar ao consumidor de alimentos crus.

Também, raramente os *S. aureus* são encontrados nos alimentos marinhos recém-capturados, contudo, eles podem estar presentes nesses produtos se eles sofrerem extensiva manipulação humana. Um exemplo é a carne de caranguejo desfiada (ITAL, 2002).

Ayulo et al. (1994), investigando *S. aureus* em peixes e mariscos na região Sul do Brasil, verificaram números elevados deste microrganismo, particularmente em mariscos e carne de caranguejo, nos quais foram detectaram cepas enterotoxigênicas.

Iaria et al. (1980) detectaram a presença de *S. aureus* enterotoxigênico em 35,3% dos manipuladores de alimentos em cozinhas hospitalares. Desses, 16,7% eram positivos para a produção de enterotoxina estafilocócica tipo C.

Pesquisas realizadas por Castro & Iaria (1984) no vestibulo nasal de 78 manipuladores de alimentos em cozinhas hospitalares de João Pessoa (PB), revelaram a presença de *S. aureus* em 42,3% deles. Outrossim, estudos realizados por Carvalho & Serafini (1996) com trabalhadores do Restaurante Universitário da Universidade Federal de Goiás/Brasil possibilitaram o isolamento de *S. aureus* e *S. epidermidis* em 44 manipuladores de alimentos, sendo 26,8% isolados da região nasal, 21,73% das mãos e 34,70% da orofaringe.

Espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa revelaram ser importantes patógenos, sendo sua identificação também considerada importante para o diagnóstico da etiologia de infecções estafilocócicas. O principal representante é o *S. epidermidis*, embora muitas outras espécies do gênero sejam coagulase negativas e também patogênicas (Jay, 2000).

2.9.4 *Vibrio parahaemolyticus*

V. parahaemolyticus foi isolado pela primeira vez por Fujino et al. (1951) no Japão, como agente de uma gastroenterite alimentar, envolvendo 272 pessoas com 20 óbitos, a partir do consumo de *shirasu*, um alimento preparado com sardinha seca e considerado o veículo da toxinfecção (ICMSF, 1996; Jay, 2000). Naquele país, o *V. parahaemolyticus* é atualmente reconhecido como o maior causador de gastroenterites de origem alimentar, provavelmente por estar associado ao consumo de alimentos marinhos, os quais são parte significativa da dieta japonesa (Forsythe, 2002).

V. parahaemolyticus é uma bactéria que comumente está associada à ingestão de pescados e mariscos contaminados, frequentemente crus ou parcialmente cozidos (Marshall et al., 1999; Daniels, 2000). Esse microrganismo é largamente disseminado em ambientes marinhos no mundo todo (Marshall et al., 1999) tendo sido isolado de ostras, mexilhões, crustáceos, peixes, plânctons, lulas e de ouriços-do-mar (Jay, 2000).

V. parahaemolyticus é uma bactéria mesófila, halófila, com maior ocorrência na época de verão, nas zonas tropicais e temperadas, porém encontrada nas águas mornas durante o ano todo, sendo isolada com frequência em animais que possuem exoesqueleto de quitina, tais como camarões e caranguejos, além de ser também isolados de moluscos e peixes (ICMSF, 1996).

Além dos produtos marinhos *in natura*, o microrganismo já foi isolado de produtos processados, como lulas resfriadas (Lima et al., 1997) na cidade de Recife. Magalhães et al. (1991) relacionaram casos de diarreias humanas ao consumo de mariscos e/ou peixes contaminados por *V. parahaemolyticus*. Sua presença já foi constatada em surtos de gastroenterite nos Estados Unidos, Japão, Europa e em muitos outros países, sempre associados à ingestão de alimentos de origem marinha (Jay, 2000; Adams & Moss, 2002).

De Paola et al. (2000) relataram a ocorrência de linhagens patogênicas de *V. paraemolyticus* isoladas de moluscos em Washington, Texas e Nova Iorque. As linhagens patogênicas foram detectadas em algumas amostras, principalmente em ostras e a sua sobrevivência foi relacionada com a temperatura e a salinidade das águas.

A patogenicidade da bactéria deve-se à produção de uma hemolisina termoestável (TDH), considerada como o fator mais tóxico de *V. parahaemolyticus*, devido à possibilidade de produzir alterações inflamatórias na mucosa intestinal de animais de laboratório (Lima, 1997; Adams & Moss, 2002).

Trata-se de uma bactéria capaz de provocar gastroenterite aguda em seres humanos. A cepa patogênica distingue-se da não patogênica devido à sua capacidade de produzir hemólise em um meio de ágar sangue específico, com alta concentração de sal, o ágar wagatsuma. Este fenômeno é conhecido como reação “Kanagawa” (Guerry & Colwell, 1977) por ter sido estudado numa cidade do mesmo nome, no Japão.

Segundo Adams & Moss (2002), 96,5% das cepas de pacientes infectados com *V. parahaemolyticus* são Kanagawa positiva, enquanto aquelas isoladas de amostras ambientais são, em 99% dos casos, Kanagawa negativas.

Quantidades relativamente baixas de *V. parahaemolyticus*, em torno de 10^3 a 10^5 de bactérias por grama da amostra, podem produzir uma infecção. Esta bactéria produz uma citotoxina semelhante à toxina Shiga, o que implica em diarreia sangüinolenta, descrita na enfermidade causada por esse microrganismo (Roitman, 1998; ICMSF, 1996).

V. parahaemolyticus tem sido estudado tanto do ponto de vista ambiental como médico e tem grande importância para a saúde pública. Os estudos epidemiológicos têm demonstrado que, dentre as espécies halofílicas, *V.*

parahaemolyticus é um enteropatógeno em potencial, com distribuição universal (Cook et al., 2002).

2.10 Doenças transmitidas por alimentos (DTAs)

A Organização Mundial de Saúde define enfermidade transmitida por alimento como sendo aquela de natureza tóxica ou infecciosa causada por agentes que invadem o organismo por meio da ingestão de alimentos contaminados (Adams & Moss, 2002).

Toxinfecções alimentares ou enfermidades transmitidas por alimentos compreendem infecções e intoxicações alimentares. As infecções são decorrentes da ingestão de alimentos contaminados com agentes infecciosos, já as intoxicações alimentares se devem à ingestão de toxinas pré-formadas nos alimentos devido à multiplicação dos microrganismos (Forsythe, 2002).

Essas doenças podem ocorrer de forma individual ou em surtos, quando um grande número de pessoas é acometida por sintomas semelhantes (Forsythe, 2002). As doenças alimentares de origem microbianas são consideradas como o mais sério problema no mundo contemporâneo e, conseqüentemente, como uma causa importante na redução econômica da produtividade (Adams & Moss, 2002).

Para Collins (1997), as enfermidades provocadas por bactérias vinculadas a alimentos são um sério problema nos Estados Unidos. Mead et al. (1999) relataram que, embora muitas enfermidades infecciosas de origem alimentar tenham sido controladas, as perdas econômicas permaneceram substanciais, estimando-se que nos Estados Unidos anualmente ocorreu, em média, 76 milhões de surtos, 323 mil hospitalizações e 5.000 óbitos e que um

entre quatro americanos adoecem, enquanto que um entre 1000 são hospitalizados todos os anos.

De acordo com a Organização Panamericana de Saúde (OPS, 2003), a segunda causa mais comum de óbitos em crianças de 0 a 5 anos, no mundo todo, é a diarreia, com estimativa de 12% dos óbitos.

Segundo Morris & Potter (1997), o grupo de indivíduos mais afetado pelas DTAs são as crianças, mulheres grávidas, idosos e pessoas com sistema imunológico imunosuprimido, como nos casos de pacientes com aids, câncer, diabetes ou os que estão sob tratamentos com quimioterápicos.

De acordo com Angelillo et al. (2000), as doenças causadas por comidas contaminadas ou bebidas são as principais causas de mortalidade em alguns países e em certas circunstâncias podem trazer sérias conseqüências. Em 1996, na Itália, foram registrados mais de 26.000 doenças veiculadas por alimentos, sendo *Salmonella* spp e o vírus da hepatite A relatados em mais de 90% dos casos.

Nas últimas décadas, a epidemiologia de doenças de origem alimentar sofreu mudanças com o aparecimento de novos importantes microrganismos e patógenos emergentes que em alguns casos não oferecem riscos para os indivíduos, porém, em outros, ameaça-lhes a vida (Tauxe, 2002).Essas mudanças podem ser atribuídas a vários fatores, incluindo estatística populacional, estilo de vida dos consumidores, desenvolvimento do processamento de alimentos, preparação e práticas de manipulação e percepção de perigos alimentares (Angelillo et al., 2000).

A Organização Panamericana de Saúde (OPS, 2003) confirma que mais de 70% dos casos de enfermidades transmitidas pelos alimentos têm origem no seu manuseio inadequado pelo consumidor final.

A contaminação cruzada pelos patógenos microbianos pode ter um importante papel nos casos esporádicos de doenças epidêmicas de origem alimentar. Durante a manipulação e preparação, as bactérias podem ser transferidas dos alimentos crus para os manipuladores e, subsequentemente para outras superfícies pelas mãos contaminadas. As mãos são também um ponto crítico para contaminação cruzada (Montville et al., 2002).

É sabido que apenas um pequeno número de casos de enfermidades causadas por alimentos é notificado aos órgãos de inspeção de alimentos, de controle e às agências de saúde, o que torna duvidosos os resultados apresentados nas estatísticas brasileiras. Isso se deve ao fato de muitos patógenos presentes em alimentos causarem sintomas brandos e a vítima não buscar auxílio médico. Portanto, o número de casos notificados pode ser entendido como a ponta do iceberg, tendo em vista o número real de toxinfecções causadas por alimentos e que não são submetidos a registros (Forsythe, 2002).

Angelillo et al. (2001) relataram que as doenças de origem alimentar são causadas principalmente pelo consumo de alimentos fora do lar.

Em 1997, de um total global de 52,2 milhões de óbitos, 17,3 milhões foram atribuídos às doenças infecciosas e parasitárias, das quais a diarreia foi responsável por 2,5 milhões de óbitos (Gorman et al., 2002).

2.11 Resistência bacteriana

O mecanismo da ação dos antibióticos não tinha sido descoberto até o século XX, embora a utilização de compostos orgânicos para o tratamento das infecções seja conhecida desde a Antiguidade. Na década de 1920, Alexandre Fleming descobriu o primeiro antibiótico, a penicilina, a partir do fungo

Penicillium notatum. Essa descoberta permitiu o desenvolvimento de posteriores compostos antimicrobianos produzidos por organismos vivos.

O desenvolvimento de agentes quimioterápicos teve impacto na medicina clínica mais do que qualquer outra descoberta. Embora uma variedade de agentes químicos naturais já tenha sido descoberta, os reais avanços com agentes quimioterápicos começaram com o cientista Paul Ehrlich, no início dos anos de 1900 (Madigan et al., 2000).

Apesar dos avanços nessa área, a resistência das bactérias aos antibióticos continua sendo um problema sério no mundo todo, particularmente na América Latina, devido a vários fatores. Entre eles, o uso sem justificativa e abuso dos antibióticos em humanos, animais e na agricultura, bem como a facilidade de aquisição de antibióticos em alguns países, onde são vendidos sem prescrição médica. Infelizmente, os dados de susceptibilidade dos antibióticos são difíceis e a vigilância da resistência não é disponível em todos os países.

O uso indiscriminado de antibióticos é responsável pela alta resistência de cepas bacterianas, segundo Sosa (1999). Para este autor, o aparecimento de patógenos resistentes constitui um problema de saúde pública. Enfermidades como a cólera, tuberculose, diarreia e pneumonia, produzidas por cepas resistentes, têm sido causa importante de mortalidade no mundo todo.

Para Threlfall et al. (2000), o uso indiscriminado dos antibióticos na alimentação animal é uma das causas da resistência das bactérias patogênicas de origem alimentar.

O aumento da resistência de patógenos a muitos dos antibióticos comumente usados tem incentivado melhores tentativas de buscar novos agentes com múltipla ação microbiana para combater infecções e superar os problemas da resistência e efeitos colaterais das drogas hoje disponíveis (Ali-Shtayeh, 1998).

Salvat et al. (2001) informaram que tem aumentado o interesse dos pesquisadores na descoberta de novos compostos antimicrobianos, devido à taxa alarmante de infecções com microrganismos resistentes aos antibióticos.

Segundo Cáceres et al. (1993), as enterobactérias têm papel importante nas diarreias e disenterias, especialmente na população infantil. Por outro lado, as pandemias regionais e a resistência dessas bactérias aos antibióticos têm sido muito estudadas. Portanto, há necessidade de se encontrar substâncias farmacologicamente ativas, capazes de combater estes microrganismos.

A aplicação desordenada de antibióticos na medicina veterinária e humana é largamente responsável pela ocorrência de bactérias resistentes. Assim, várias cepas de bactérias patogênicas intestinais estão associadas às infecções emergentes e reemergentes, dentre elas *Salmonella* spp, *Escherichia coli* e algumas espécies de vibrios (Duffy, 1999).

Os microrganismos patogênicos humanos multirresistentes têm sido estudados no mundo todo (Ali-Shtayeh, 1998; Cristino, 1999; Duffy et al., 1999; Salvat, 2001). A ocorrência de cepas resistentes é uma situação agravante para a saúde pública e responsável por milhões de morte no mundo todo, principalmente as infecções hospitalares. Portanto, a busca por novos fármacos é um dos desafios enfrentados pelos cientistas (Ahmad & Beg, 2001).

Para Franco et al. (1990), o uso indiscriminado de antibióticos, particularmente nos alimentos de origem animal, tem favorecido a seleção de linhagens cada vez mais resistentes e, portanto, de difícil tratamento médico. Os autores alertam para o uso indevido ou indiscriminado de antibióticos com riscos à saúde uma vez que o uso de drogas por longo prazo, pode ocasionar uma seleção de microrganismos resistentes.

Como os microrganismos são responsáveis por diversos tipos de infecções que acometem o ser humano e o uso indiscriminado dos antibióticos

conduz a uma redução de atividade sobre esses microrganismos, surge, então, a necessidade da procura por novas formas de tratamento. Assim, as plantas medicinais podem oferecer uma nova fonte de agentes antimicrobianos. Em muitas partes do mundo elas são usadas, já tendo sido comprovada sua atividade antibacteriana, antifúngica e antiviral (Essawi & Sour, 2000).

Desse modo, pesquisas por novos agentes antimicrobianos, em particular os fitoterápicos, têm se intensificado na última década, principalmente por causa do aumento das infecções bacterianas (Facey et al., 1999).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção dos óleos

Os óleos essenciais utilizados no experimento de goiabeira, *Psidium guajava* L. e o de alfavaca, *Ocimum gratissimum* L. foram extraídos das folhas e o do gengibre, *Zingiber officinale* Roscoe, do rizoma da planta. Esses óleos foram doados pelo Laboratório de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.

O óleo essencial do pau-rosa, *Aniba duckei* Kostermans foi extraído do caule da planta e doado pela Universidade Federal do Amazonas, enquanto o óleo da pimenta dióica, *Pimenta dioica* Lindl, foi extraído do fruto e cedido pela Universidade Federal do Maranhão.

3.2 Isolamento das cepas testes a partir de sururu, *Mytella falcata* d'Orbigny

Setenta e uma amostras de sururu foram coletadas em quatro estuários (Bacanga, Anil, Maioba e Pau Deitado) e 64 nas feiras dos bairros: Cohab, Anil, João Paulo e Centro, localizadas na cidade de São Luís, MA, totalizando 135 amostras.

Após coletados nos estuários, os moluscos foram transportados ao Laboratório de Controle de Qualidade de Alimentos da Universidade Federal do Maranhão, onde foram lavados e escovados com água corrente e enxaguados em água destilada. Após abertura de suas conchas, de forma asséptica, com auxílio de faca estéril, o líquido e a massa muscular foram homogeneizados em liquidificador desinfetado, sob condições higiênicas para análises posteriores.

As amostras do molusco adquiridos nas feiras foram acondicionadas em saco de polietileno e transportadas imediatamente para o laboratório e igual procedimento foi adotado.

3.3 Isolamento e identificação das bactérias do molusco

3.3.1 *Escherichia coli*

Para o isolamento e identificação de *Escherichia coli* foram utilizadas as técnicas descritas por *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* – APHA (1992), *International Commission on Microbiological Specifications for Foods* – ICMSF (1983) e Sistema API 20E (bioMérieux).

Inicialmente, o homogenato, sururu e água peptonada, na relação 1:10, foi diluído e inoculado em alíquotas de 1mL em tubos com caldos lauril triptose sulfato/bile verde brilhante e EC(Merck), os quais foram incubados a 37°C e 45°C por 24-48 horas, respectivamente, seguido de isolamento em meio seletivo diferencial ágar eosina azul de metileno-EAM-Levine (Merck) para posterior identificação de *E. coli*. As colônias típicas (centro escuro com ou sem brilho metálico) foram transferidas para tubos inclinados de ágar tripton de soja-TSA-(Merck), sendo estes incubados a 37°C, por 24 horas. Após a incubação, as colônias foram submetidas à identificação, utilizando-se o kit API 20E (bioMérieux).

3.3.2 *Salmonella* spp

A metodologia adotada obedeceu às técnicas recomendadas pelo APHA (1992) e API 20E (bioMérieux) e constou das seguintes análises:

3.3.2.1 Pré-enriquecimento

Vinte e cinco gramas dos moluscos foram homogeneizados em 225mL de água peptonada tamponada-APA, pH 6,9 e incubados a 37°C, durante 24 horas.

3.3.2.2 Enriquecimento seletivo

Após a fase de pré-enriquecimento, alíquotas de 0,1mL e 1mL foram transferidas de forma asséptica para tubos contendo 9,9mL e 9mL de caldo Tetrionato(Merck) e de caldo Rappaport-Vassiliadis(Merck), respectivamente, os quais eram incubados a 43°C, durante 24 horas.

3.3.2.3 Plaqueamento seletivo

A partir do crescimento no meio de enriquecimento seletivo, alíquotas foram semeadas de forma asséptica, em placas contendo ágar Rambach(Merck) e ágar Hektoen(Merck). As placas foram incubadas a 37°C, por 24 horas.

3.3.2.4 Identificação presuntiva

Do plaqueamento seletivo foram retiradas de cada placa semeada, colônias com características de *Salmonella* e inoculadas em tubos inclinados de ágar triplice açúcar ferro-TSI(Merck) e ágar lisina ferro-LIA(Merck), sendo estes incubados a 37°C por 24 horas. Após a incubação, realizava-se a leitura. As cepas eram consideradas suspeitas de *Salmonella* quando apresentavam positividade nas provas da lisina, glicose e produção de H₂S.

3.3.2.5 Testes para confirmação

A confirmação bioquímica das cepas de *Salmonella* foi realizada com a utilização do kit API 20E (bioMérieux).

3.3.3 Pesquisa de *Staphylococcus coagulase positiva*

Para a pesquisa de *Staphylococcus coagulase positiva* foi utilizada a técnica descrita no APHA (1992). Aliquotas de 0,1mL das diluições decimais foram semeadas, com auxílio de alças de Drigalski, na superfície do meio ágar Baird-Parker-ABP(Merck). Após incubação a 37°C por 24-48 horas, cinco colônias típicas (negras com halo) foram selecionadas de cada placas e submetidas a testes bioquímicos:

3.3.3.1 Confirmação das colônias típicas

As colônias típicas eram transferidas para tubos contendo caldo infusão cérebro coração-BHI(Merck) e, após incubação a 35°C por 24 horas, uma alíquota de cada tubo era transferida para tubos de TSA inclinado e incubados a 35°C, por 24 horas.

3.3.3.2 Teste de coagulase

Dos cultivos em BHI foram transferidas alíquotas de 0,2mL para tubos estéreis e adicionados 0,5mL de plasma de coelho com EDTA. A seguir com movimentos de rotação as partes eram misturadas, sem agitação dos tubos. Logo após, os tubos eram incubados em banho-maria a 37°C e a leitura era feita a cada

hora até 24h, para observação da formação do coágulo e indicação de positividade para *S. aureus*.

3.3.3.3 Teste de catalase

Nesta prova, gotas de Peróxido de Hidrogênio a 3% eram adicionadas a cada cultura e, se houvesse um borbulhamento imediato pela liberação de oxigênio molecular, o teste era considerado positivo.

3.3.3.4 Teste de termonuclease

A partir do caldo BHI, foram transferidas alíquotas da cultura para tubos de ensaio e levados ao banho-maria por um tempo de 15 minutos. Após fervura, o inóculo era depositado em orifícios previamente feitos nas placas de ágar azul de toluidina-DNA(Merck). As placas eram recobertas com papel de filtro umidificado e incubadas a 37°C, por 4 horas. Após a incubação, verificava-se se havia formação de um halo róseo, estendendo-se por cerca de 1mm ao redor das perfurações inoculadas (teste positivo).

3.3.3.5 Coloração de gram

Todas as colônias com características de *S. aureus*, depois de isoladas eram fixadas em lâminas e coradas pelo método de gram para comprovação das características morfológicas e tintoriais das cepas (cocos, gram-positivos).

3.3.3.6 Utilização dos carboidratos, glicose e manitol em anaerobiose

A partir da cultura em TSA, crescida a 37°C por 24 horas, eram feitas sementeiras em tubos contendo caldo púrpura de bromocresol(Merck) enriquecido com 0,5% de glicose e manitol. Em seguida, adicionava-se 1mL de óleo mineral estéril em cada tubo, cobrindo o inóculo. Os tubos semeados eram incubados a 37°C e as leituras eram feitas a cada 24 horas até o 5º dia após a inoculação, sendo o teste considerado positivo quando ocorria a produção de ácido, indicada pela mudança de coloração para amarelo.

3.3.3.7 Teste de Voges-Proskauer – produção de acetoina

Para esta prova foram distribuídas alíquotas de 3mL do caldo vermelho de metila-Voges Proskauer-MR-VP(Merck) em tubos e inoculados com alíquotas do cultivo das cepas suspeitas de *S. aureus*. Após 48 horas, eram adicionados 0,2mL do reagente Barrit I e 0,6mL do reagente Barrit II, com leitura realizada após 15 minutos. A reação positiva caracterizava-se pelo aparecimento de uma coloração vermelha.

3.3.4 *Vibrio parahaemolyticus*

Para isolamento e identificação de *Vibrio parahaemolyticus* foi utilizada a técnica descrita por Twedt (1984). Alíquotas de 1mL das diluições escolhidas foram inoculadas em duplicata em água peptonada alcalina e, em seguida, incubadas a 35°C, por 24 horas. Dos tubos que apresentavam turvação foram estriadas placas de Petri contendo ágar tiosulfato-citrato-bile-sacarose-TCBS (Merck) com ajuda de uma alça de níquel cromo e estas foram incubadas a 35°C, por 24 horas.

A partir das culturas crescidas em meio TCBS foram pescadas até 3 colônias suspeitas de *V. parahaemolyticus*, ou seja, colônias verde-azuladas, não fermentadoras de sacarose. Cada colônia isolada foi inoculada simultaneamente em tubos com TSA, TSB, TSI e ágar SIM(Merck), todos contendo 3% de cloreto de Sódio. Os meios inoculados foram incubados a 35°C, por 24 horas. Decorrido este período, verificavam-se as características morfológicas das cepas isoladas, por meio de esfregaços corados pelo método de gram, preparados a partir das culturas em TSA. Paralelamente, realizavam-se as leituras dos resultados nos meios TSI e SIM.

As cepas que se revelaram no esfregaço corado, como bacilos gram-negativos, polimorfos encurvados ou não e que no ágar TSI fossem produtoras de ácido sem gás, a partir da glicose (base ácida com cor amarela), não fermentadoras de sacarose nem de lactose (bisel alcalino, vermelho), negativos para a produção de H₂S e móveis no meio SIM, eram submetidas às provas de identificação bioquímica adicionais.

3.3.4.1 Prova de produção de citocromo-oxidase

Para a realização desta prova foi utilizado o disco Bactident Oxidase - Merck. O teste era considerado positivo quando mudava a cor para roxa, prova considerada positiva para *V. parahaemolyticus*.

3.3.4.2 Prova da hidrólise da arginina e da descarboxilação da lisina e ornitina

Nestas provas, a partir das culturas crescidas em TSA a 35°C por 24 horas, foram inoculados tubos (três) com meio basal para hidrólise e descarboxilação de aminoácidos(Merck), preparado com 3% de cloreto de sódio

e adicionados, respectivamente, de arginina, ornitina e lisina. Simultaneamente, cada cepa era inoculada em um tubo controle. Este tubo continha o meio basal, sem a adição de aminoácidos. Os tubos recebiam, após a inoculação, uma camada de aproximadamente 1cm de vaselina líquida estéril e eram incubados a 35°C, por 7 dias. As provas de hidrólise da arginina e descarboxilação da lisina eram consideradas positivas quando os tubos com as culturas (tubos testes) com os aminoácidos apresentavam cor púrpura e os tubos com controle (tubos com o meio basal + cultivo, sem os aminoácidos) apresentavam a cor amarela. *V. parahaemolyticus* descarboxila a lisina e ornitina (tubos com a cor púrpura) mas não hidrolisa a arginina (tubos com a cor amarela).

3.3.4.3 Prova do halofilismo

Culturas crescidas por 24 horas a 35°C, em TSB, contendo cloreto de sódio, foram inoculadas em quatro tubos de caldo triptona(Merck) a 1%, adicionados de 0%, 6%, 8% e 10% de cloreto de sódio, respectivamente. *V. parahaemolyticus* apresenta crescimento em caldo triptona com 6 e 8% de cloreto de sódio e não cresceu em 0% e 10%.

3.3.4.4 Prova de Voges-Proskauer

Tubos contendo caldo MR-VP+3% de cloreto de sódio foram inoculados com culturas crescidas em TSA, os quais foram incubados 35°C por 48 horas. Logo após a incubação, eram transferidas aliquotas de 1mL de cada cultura para tubos estéreis e adicionavam-se 0,6mL de solução alcoólica de alfa-naftol (Merck) e 0,2mL de uma solução aquosa de hidróxido de potássio a 40%, agitando-se em seguida. As leituras eram realizadas após quatro horas. *V. parahaemolyticus* foi negativo para este teste.

3.3.4.5 Prova da fermentação de carboidratos

Alçadas do crescimento em TSA eram transferidas para tubos de caldo púrpura de bromocresol acrescido de manitol, lactose e arabinose, respectivamente. Após a inoculação, os meios foram cobertos com uma camada de vaselina líquida estéril e, em seguida, incubados por até uma semana a 35°C, com leituras diárias. *V. parahaemolyticus* na prova de fermentação para a lactose foi negativo, positivo para o manitol, podendo variar para a arabinose.

3.3.4.6 Prova de crescimento a 42°C

A partir da cultura em TSB foram inoculados tubos contendo o mesmo meio, porém com 2% de cloreto de sódio, seguido de incubação em banho-maria com agitação a 42°C por 24 horas. *V. parahaemolyticus* foi positivo nesse teste .

3.3.4.7 Cepas-controle

Cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Salmonella Choleraesuis* (ATCC 12011) e *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC 17802) foram usadas como controle em todos os experimentos. Essas cepas foram doadas pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) do Rio de Janeiro.

3.4 Testes de susceptibilidade aos óleos essenciais

A atividade antimicrobiana dos cinco óleos essenciais foi avaliada utilizando-se dois métodos distintos: difusão de discos (Lenette, 1985) e difusão radial em duas camadas de ágar perfurado (Pereira et al., 1999).

3.4.1 Método de difusão de discos (MDD)

Cepas testes de *E. coli*, *S. coagulase* positiva, *Salmonella* spp e *Vibrio parahaemolyticus* foram crescidas em caldo BHI com diluições sucessivas e comparadas até uma turbidez de 0,5 na escala de MacFarland (Mahon & Manuselis Jr, 1985). O inóculo (0,25mL) de cada bactéria foi semeado, com auxílio de alça de Drigalski, sobre a superfície das placas de ágar contagem padrão-PCA-Merck e sobre este foram aderidos pequenos discos de papel de filtro de 6 mm, impregnados com 75µL dos diferentes óleos essenciais, com o auxílio de uma pinça previamente flambada. Os discos eram pressionados levemente contra a superfície do meio. As placas eram incubadas a 37°C por 24 horas. A leitura dos halos de inibição foi feita com a utilização de uma régua milimetrada.

3.4.2 Método de difusão radial em duas camadas de ágar perfurado (MDRCAP)

Nesse método, após crescimento das cepas teste em caldo BHI, eram retirados 0,25mL e inoculados, com a alça de Drigalski, sobre a primeira camada da placa de petri contendo o meio de PCA, por meio da técnica de espalhamento. Após 10 minutos em temperatura ambiente foi adicionada a segunda camada do PCA. O meio era colocado sob temperatura de refrigeração, aproximadamente 10 minutos e, em seguida, eram feitas perfurações com um cilindro metálico de, aproximadamente 6 mm de diâmetro e cada cavidade preenchida com 75µL dos diferentes óleos, sendo as placas mantidas à temperatura de 4°C em estufa BOD, por um período de 3 horas com absorção completa do óleo. Logo após, as placas eram incubadas em condições de aerobiose a 37°C por 24 horas. A leitura dos

halos de inibição era feita utilizando-se uma régua milimetrada. Ambas as técnicas foram realizadas com três repetições.

3.5 Susceptibilidade das cepas isoladas de molusco aos antimicrobianos convencionais

O comportamento das cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Staphylococcus* coagulase positiva e *Vibrio parahaemolyticus*, isoladas dos moluscos, foi testado frente à ação de antimicrobianos comerciais segundo o método de Kirby-Bauer (Bauer et al., 1966). Durante a execução do teste, cepas controle de *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Staphylococcus* coagulase positiva e *Vibrio parahaemolyticus* ATCC foram usadas para comparação da medida dos halos. Três cepas foram selecionadas de cada espécie para os testes de susceptibilidade aos antimicrobianos e aos óleos essenciais.

3.5.1 Preparo do inóculo

As culturas bacterianas foram inoculadas em caldo BHI e, após 24 horas de incubação a 37°C, procedeu-se a diluição até obtenção de uma suspensão padronizada pelo grau 0,5 da escala de McFarland (10^8 microrganismos/mL).

3.5.2 Semeadura das placas

De cada cultura foram tomados 0,25mL e semeados com alça de Drigasliki na superfície de placas contendo ágar Mueller Hinton. As placas permaneciam à temperatura ambiente por cinco minutos antes da aplicação dos discos de antibióticos.

3.5.3 Aplicação dos discos

Os discos impregnados com os antimicrobianos foram distribuídos nas placas, com o auxílio de uma pinça previamente flambada, de forma asséptica, distantes 20cm um do outro, e pressionados levemente contra a superfície do meio. A seguir as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Os antimicrobianos utilizados foram tetraciclina (tet 30µg), gentamicina (gen 10µg), cefoxitina (cfo 30µg), cloranfenicol (clo 30µg), sulfazotrim (sut 25µg), oxacilina (oxa 1µg), ampicilina (amp 10µg), cefotaxima (ctx 30µg), vancomicina (van 15µg), eritromicina (eri 15µg), lincomicina (lin 2µg) e ácido pipemídico (pip 20µg).

A leitura dos halos de inibição foi feita com a utilização de uma régua milimetrada, comparando-se os valores obtidos com a tabela padrão.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados percentuais de cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Staphylococcus* coagulase positiva e *Vibrio parahaemolyticus* isoladas a partir de moluscos comercializados nas feiras livres de São Luís encontram-se na Tabela 1. Constatou-se que do total de 64 amostras de moluscos analisadas, 32 (50%) estavam contaminadas com *E. coli* e 56 (87,5%) apresentaram contaminação de *S. coagulase* positiva. Não houve contaminação das amostras por *Salmonella* spp e *V. parahaemolyticus*.

A presença de *E. coli* em alimentos representa um risco para os consumidores, principalmente porque algumas espécies são comprovadamente patogênicas e, portanto, responsáveis por diarreias e enfermidades graves, tais como colites hemorrágicas e síndrome urêmica. Segundo Adams & Moss (2002) certos sorotipos dessa espécie podem produzir dois tipos de toxinas, sendo uma termolábel (LT), que é inativada a 60°C por 30 minutos e outra termoestável (ST), que suporta 100°C por 15 minutos.

TABELA 1. Frequência de isolamento de *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Staphylococcus* coagulase positiva e *Vibrio parahaemolyticus* em amostras de moluscos comercializadas das quatro feiras livres de São Luís, MA.

Feiras	Número de Amostras	Frequência de isolamentos			
		<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> spp	<i>S. coagulase</i> positiva	<i>V. parahaemolyticus</i>
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Anil	16	6 (37,5)	0	15 (93,7)	0
Cohab	16	9 (56,2)	0	13 (81,2)	0
João Paulo	16	7 (43,7)	0	14 (87,5)	0
Centro	16	10 (62,5)	0	14 (87,5)	0
Total	64	32	0	56	0

De todas as amostras coletadas na feira, foram isoladas cepas de *S. coagulase positiva* (Tabela 1).

Atanassova et al. (2001) relataram que em muitos países o *S. aureus* é a segunda causa de doença de origem alimentar, sendo a enterotoxina responsável pelas intoxicações alimentares. Esta toxina pode ser produzida quando a população do microrganismo excede a 10^5 UFC/g (Gorman et al., 2002).

Ayulo et al. (1994) avaliaram as condições microbiológicas dos pescados e moluscos capturados na costa do estado de Santa Catarina e comercializados em Florianópolis e verificaram que 20% das amostras analisadas de molusco estavam contaminadas com *S. aureus*, das quais nove cepas produziram enterotoxinas. Os autores ressaltaram o risco da ingestão dessas amostras contaminadas ocasionarem uma intoxicação alimentar.

Os índices de ocorrência de *S. aureus* na presente pesquisa foram maiores dos que aqueles encontrados por Ayulo et al. (1994). Essa diferença pode estar relacionada com a qualidade da água onde os moluscos foram capturados, além da manipulação excessiva, tempo e temperatura de armazenamento desses moluscos.

Schlimme (1995) atribui a presença desse microrganismo ao manuseio intenso e à falta de conhecimentos higiênicos por parte dos manipuladores. Muitas vezes, essa contaminação é agravada pela manutenção do alimento à temperatura ambiente por longo período durante a comercialização. Esses fatos foram comprovados por Saddik et al. (1985), quando pesquisaram o perfil microbiológico de peixes, mariscos e moluscos em diversos restaurantes no Egito e concluíram que 75% das amostras de peixes cozidos estavam com *S. coagulase positiva*, devido à manipulação após o cozimento.

A Tabela 2 apresenta os percentuais de *E. coli*, *Salmonella* spp, *S. coagulase positiva* e *V. parahaemolyticus* em moluscos capturados nos estuários.

De um total de 71 amostras de moluscos analisadas, 68 (95,7%) estavam contaminadas com *E. coli*, 22 (31%) com *Salmonella* spp e 53 (74,6%) com *V. parahaemolyticus*. Em nenhuma amostra foi detectada contaminação por cepas de *S. coagulase* positiva.

O percentual de *E.coli* nos moluscos oriundos dos estuários foi superior àquele observado nos bivalves adquiridos nas feiras livres (Tabela 1 e 2). Sendo assim, os moluscos dos estuários estariam mais contaminados em virtude do meio onde eles são capturados serem permanentemente poluídos enquanto que os da feira, possivelmente já tendo sofrido um processamento de calor a fim de serem abertas suas conchas, tiveram sua carga bacteriana reduzida.

Para Jay (2002), a microbiota dos moluscos varia consideravelmente, dependendo da qualidade da água nas quais são capturados e lavados. Semelhante afirmação foi feita por Manzanares et al. (1992) quando afirmam que a poluição microbiológica das águas onde os moluscos são capturados é o principal problema em quase todo litoral dos países desenvolvidos.

De acordo com Croci et al. (2002), moluscos contaminados com coliformes e *Salmonella* spp foram responsáveis, nos Estados Unidos, nos últimos 25 anos, por inúmeros surtos de gastroenterite.

Enquanto que nas amostras de moluscos oriundos das quatro feiras livres de São Luís não foi constatada a presença de *Salmonella* spp (Tabela 1), aquelas obtidas diretamente dos estuários apresentaram um índice de 31% de contaminação em 71 amostras (Tabela 2). Segundo Vantarakis et al. (2000), esses microrganismos são frequentemente agentes etiológicos de gastroenterites associadas a moluscos, particularmente ostras e sururus crus.

TABELA 2. Frequência de isolamento de *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Staphylococcus* coagulase positiva e *Vibrio parahaemolyticus* em amostras de moluscos *in natura* coletados nos quatro estuários de São Luís,MA.

Estuários	Número de amostras	Frequência de Isolamentos			
		<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i> spp	<i>S. coagulase</i> positiva	<i>V. parahaemolyticus</i>
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Bacanga	19	19 (100)	5 (26,3)	0	18 (94,7)
Anil	17	14 (82,3)	6 (35,2)	0	11 (64,7)
Maioba	18	18 (100)	4 (22,2)	0	12 (66,6)
Pau deitado	17	17 (100)	7 (41,1)	0	12 (70,5)
Total	71	68	22	0	53

A salmonelose é uma infecção de importância para a saúde pública devido ao impacto sócio-econômico que ocasiona nos países desenvolvidos e em desenvolvimento; é também uma enfermidade aguda transmitida pelos alimentos, afetando todos os grupos de idade, com maior incidência em crianças menores de cinco anos. Em vários países, a detecção de *Salmonella* tem alcançado proporções epidêmicas. Por esta razão, os resultados da presente investigação são preocupantes e merecem atenção por parte das autoridades sanitárias locais.

Cogco et al. (2000) relataram que os casos de salmonelose, no México, registraram um aumento substancial, devido ao consumo de alimentos contaminados por *S. Enteritidis*. Nos Estados Unidos, os casos de salmonelose são aproximadamente de 60% e no Japão, onde os pratos são preparados, na maioria das vezes, com pescados crus, a salmonelose tem ocorrência de 70%. Já em países em desenvolvimento, como a Índia, não havendo um sistema de monitoramento, o número exato da infecção é desconhecido. Portanto, pescados,

moluscos e crustáceos são implicados como veículos principais dos surtos de origem alimentar (Hatha & Lakshmanaperumalsamy, 1997).

No Brasil, Peresi et al. (1998) relataram surtos de salmonelose ocorridos de julho de 1993 a junho de 1997, na região noroeste do estado de São Paulo. Estes autores encontraram que 100% das amostras dos alimentos suspeitos continham *S. Enteritidis* e 80,5% das amostras de fezes das pessoas que consumiram esses alimentos apresentaram essa bactéria, sendo classificada como do tipo fagócito 4 (PT4).

Hatha & Lakshmanaperumalsamy (1997) pesquisaram a frequência de *Salmonella* em peixes e crustáceos comercializados no Sul da Índia e concluíram que a frequência do isolamento de *Salmonella* nas amostras estava relacionado à estação do ano e a altas temperaturas. Durante a temporada de ventos houve uma elevada incidência de *Salmonella*, o que pode ser devido à influência da drenagem de esgoto nessa estação.

Não foi detectada a presença de *S. coagulase* positiva nos moluscos capturados nos estuários (Tabela 2). Segundo o Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL, 2002), esses microrganismos raramente são encontrados em alimentos marinhos recém-capturados, o que pode explicar sua ausência na microbiota nos moluscos analisados.

Provavelmente, a ausência de *S. coagulase* positiva nos moluscos do estuário pode ser explicada evocando-se Jay (2000), quando cita que esse microrganismo tem baixa competitividade com a microbiota normal.

Verifica-se que de um total de 71 amostras de moluscos coletados nos estuário, 53 (74,6%) estavam contaminadas por *V. parahaemolyticus* (Tabela 2). Esta bactéria faz parte do litoral de todos os continentes, tendo sido isolada em águas costeiras, sedimentos e alimentos marinhos. Vários surtos relacionados a

essa bactéria já foram notificados nos Estados Unidos, Europa e Japão (Adams & Moss, 2002).

V. parahaemolyticus é de ocorrência comum em ambientes onde a temperatura da água encontra-se acima de 15°C (Roitman et al., 1988; ICMSF, 1998), sendo mais freqüentemente isolado em águas cujas temperaturas situam-se entre 30° e 37°C (Beuchat, 1982), faixa de temperatura comum nos estuários da região maranhense.

Segundo Croci et al. (2002), os moluscos crus ou parcialmente cozidos têm sido muito associados com gastroenterites e são responsáveis por 20% das doenças de origem alimentar nos Estados Unidos.

No Brasil, a primeira referência sobre o isolamento de *V. parahaemolyticus* faz alusão a uma pesquisa realizada com peixes por Hofer & Silva (1979). Também foi reportado o isolamento da bactéria em caudas de lagostas no Ceará (Vieira & Iaria, 1993), de amostras de mexilhões em Santa Catarina (Archer & Moretto, 1994), em camarão no Maranhão (Nascimento et al., 1998) e em ostras, no Rio de Janeiro (Pereira et al., 2001).

De acordo com a Resolução n.º 12/2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os moluscos bivalves podem ter um Número Mais Provável (NMP) para coliformes a 45°C de 5x10/g; *S. coagulase* positiva até um máximo de 1000 unidades formadoras de colônias (UFC/g) e ausência de *Salmonella* spp na amostra. A referida resolução não estabelece parâmetros microbiológicos para *V. parahaemolyticus* em moluscos mas, por se tratar de um patógeno muito associado com toxinfecções, os resultados da presente pesquisa são indicativos de risco potencial para a população consumidora de sururus.

As atividades antimicrobianas determinadas pelo método difuso de disco (MDD) e método difuso radial em duas camadas de ágar perfurado(MDRCAP)

em relação às bactérias isoladas de moluscos estão apresentadas nas Tabelas 3 e 4.

Os halos de inibição obtidos por meio do MDD variaram de 12 a 26mm de diâmetro, considerando-se todos os óleos e bactérias estudados (Tabela 3).

TABELA 3. Atividade antimicrobiana, demonstrada por meio da medição do tamanho dos halos de inibição de cinco diferentes óleos essenciais testados contra bactérias isoladas de molusco, utilizando-se o método de difusão de disco (MDD)

Cepas	Óleo essencial (mm)				
	Goiabeira ¹	Alfavaca ²	Gengibre ³	Pau-rosa ⁴	Pimenta dióica ⁵
<i>Escherichia coli</i>	14	19	19	18	23
<i>Staphylococcus coagulase positiva</i>	20	14	17	20	16
<i>Salmonella spp</i>	12	20	19	22	19
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	15	18	26	22	22

¹*Psidium guajava* L.; ²*Ocimum gratissimum* L.; ³*Zingiber officinale* Roscoe; ⁴*Aniba duckei* Kostermans; ⁵*Pimenta dioica* Lindl

TABELA 4. Atividade antimicrobiana, demonstrada por meio da medição do tamanho dos halos de inibição de cinco diferentes óleos essenciais contra bactérias isoladas de molusco, utilizando-se o método de difusão radial em duas camadas de ágar perfurado (MDRCAP)

Cepas	Óleos essenciais (mm)				
	Goiabeira ¹	Alfavaca ²	Gengibre ³	Pau-rosa ⁴	Pimenta dióica ⁵
<i>Escherichia coli</i>	15	14	11	14	14
<i>Staphylococcus coagulase positiva</i>	18	15	12	28	17
<i>Salmonella spp</i>	13	18	19	21	17
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	14	19	15	16	17

¹*Psidium guajava* L.; ²*Ocimum gratissimum* L.; ³*Zingiber officinale* Roscoe; ⁴*Aniba duckei* Kostermans; ⁵*Pimenta dioica* Lindl

Segundo Alzoreky & Nakahara (2003), halos apresentando valores menores que 12mm, quando utilizaram extratos de plantas, não são considerados indicativos de atividade antibacteriana. Os dados mostraram que o menor halo de inibição (12mm) obtido pelo método de difusão de disco (MDD) foi apresentado pelo óleo essencial de *Psidium guajava* L. (goiabeira), para cepa de *Salmonella* spp.

Por outro lado, a variação do diâmetro dos halos de inibição, quando usado o método de difusão radial em duas camadas de ágar perfurado (MDRCAP), variou de 11 a 28mm (Tabela 4).

No MDD, *V. parahaemolyticus* foi a bactéria, dentre as testadas, que demonstrou maior sensibilidade a um dos óleos essenciais testados, o de gengibre, *Zingiber officinale* Roscoe com um máximo de tamanho de halo de 26mm (Figura 6) *Salmonella*, nesse método testado, foi que apresentou menor tamanho de halo de inibição, demonstrado para o óleo essencial de goiabeira, *Psidium guajava* L (Tabela 3).

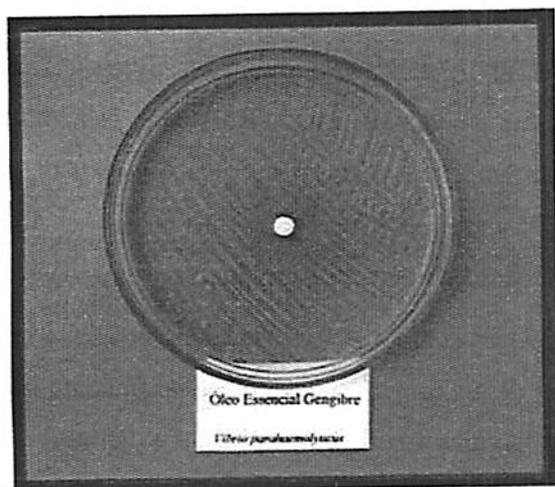


FIGURA 6. Atividade antimicrobiana do óleo essencial do gengibre em relação ao *Vibrio parahaemolyticus*

No mesmo método (MDD), o óleo de *Psidium guajava* L. (goiabeira) mostrou maior atividade antimicrobiana frente a *S. coagulase* positiva, seguido de *V. parahaemolyticus*, *E. coli* e *Salmonella* spp. Vários estudos (Tona et al., 1998; Vieira, 2001; Lin et al., 2002) têm demonstrado que *P. guajava* L. possui atividade antimicrobiana e antidiarréica. Segundo Lutterodt (1989), a quercetina é a substância responsável por inibir a acetilcolina liberada no trato gastrointestinal, o que justifica a atividade antidiarréica da planta. Lin et al. (2002) também citam que vários compostos químicos isolados das folhas de *P. guajava* L. possuem atividade antibacteriana contra diferentes espécies de bactérias gram-negativas e positivas.

Vieira et al. (2001) testaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de goiabeira frente a *S. aureus*, *Salmonella* spp e *E. coli* isoladas de camarão e somente *S. aureus* apresentou susceptibilidade. Resultado semelhante foi demonstrado no presente estudo, entretanto, nossos achados diferiram dos autores em relação a *Salmonella* spp e *E. coli*. Os dados apresentados na Tabela 4 apresentam valores, no tamanho dos halos de 15 e 13mm, respectivamente, para as bactérias citadas (Figura 7).

Holetz et al. (2002) pesquisaram a atividade antimicrobiana de 13 extratos de plantas medicinais brasileiras contra bactérias e leveduras. Seus resultados mostraram que o extrato de goiabeira possui moderada atividade contra as bactérias gram-positivas e negativas. No entanto, apresentou boa atividade contra todas as espécies de leveduras pesquisadas.

Segundo Jaiarj et al. (1999), as folhas de goiabeira contêm flavonóides e alguns derivados de glicosídeos, que sofrem hidrólise no trato gastrointestinal e podem desempenhar uma atividade que paralisa a diarreia.

O óleo essencial usado na pesquisa foi extraído das folhas da goiabeira, as quais possuem, segundo Tona et al. (1998), vários constituintes químicos tais,

como flavonóides, taninos, esteróides, terpenos e saponinas com atividade espasmolítica. As folhas da goiabeira são muito utilizadas nos países africanos para o tratamento de amebas, conforme relatou Kambu (1990).

Gnan & DeMello (1999) testaram a atividade antimicrobiana de diferentes extratos de plantas e mostraram que o extrato das folhas da goiabeira apresentou nível mais elevado de atividade sobre *S. aureus*, sendo muito baixa sua atividade sobre *S. Typhimurium*. Os resultados do presente trabalho foram semelhantes aos achados desses autores: o óleo da goiabeira apresentou a menor atividade quando testado frente a cepas de *Salmonella* spp nos dois métodos utilizados (Tabelas 3 e 4).

Andrade Neto (1994) relata que a diferença da atividade antibacteriana dos óleos essenciais deve-se à variação da composição e dos tipos de constituintes presentes.

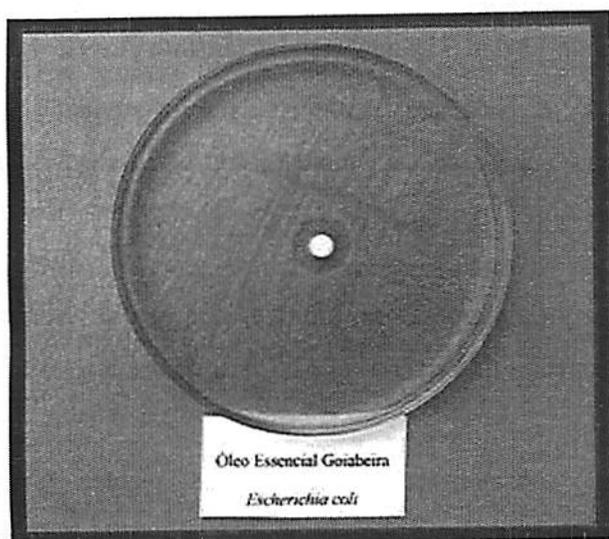


FIGURA 7. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de goiabeira contra a *Escherichia coli*

O gengibre, no MDD, teve um comportamento diferente do apresentado no MDRCAP frente às cepas de *E. coli*. No primeiro, o tamanho de seu halo de inibição foi de 19 mm contra 11 mm mostrado no segundo método (Tabela 3 e 4). Para Fyfe et al. (1998), essa planta não possui atividade antibacteriana, o que corrobora com a afirmação de Pereira et al. (1999). Segundo estes autores, 13mm deveria ser a medida mínima do halo para que se confira a um extrato a propriedade antibacteriana. A grande diferença no tamanho dos halos, acima mencionada, poderia estar relacionada com o emprego de diferentes metodologias, com consequência na difusibilidade dos óleos essenciais.

Os dados obtidos no método MDD (Tabela 3) assemelham-se aos encontrados por Srinivasan et al. (2001), os quais analisaram a atividade antimicrobiana de extrato de gengibre sobre *E. coli*, *S. Paratyphi*, *S. Typhi* e *S. aureus*, mostrando que esse extrato apresentou uma excelente atividade inibitória para os patógenos citados. Entretanto, destoam em relação a *E. coli* e *S. coagulase* positiva quando o método usado foi o MDRCAP cujos halos de inibição foram de 11 mm e 12 mm, respectivamente (Tabela 4).

Alzoreky & Nakahara (2003) estudaram a atividade antimicrobiana de algumas plantas comestíveis comumente consumidas na Ásia, dentre elas o gengibre, contra a *S. aureus*, *E. coli* e *Salmonella* spp. O extrato de gengibre apresentou zona de inibição somente para *S. aureus*, diferente dos resultados encontrados na presente pesquisa, uma vez que, o óleo essencial dessa planta inibiu as três espécies de bactérias citadas quando usados o MDD e o MDRCAP (Tabelas 3 e 4).

Segundo Otshudi et al. (1999), as plantas contêm substâncias microbianas inibitórias, como os flavanóides e agliconas, que são mais ativas do que seus glicosídeos, naturalmente presentes nas plantas. Essawi & Srour (2000) também afirmam que a atividade antibacteriana das plantas deve-se à

presença de diferentes agentes químicos, tais como timol, flavonóides, triterpenóides e outros compostos de natureza fenólica ou grupos hidroxil livres, classificados como compostos antimicrobianos ativos.

A atividade antimicrobiana do óleo essencial de alfavaca, *Ocimum gratissimum* L. contra o *S. coagulase* positiva e a *Salmonella* spp pode ser considerada eficiente (halos maiores que 13mm) em ambos os métodos (Tabela 3 e 4). Diferentes resultados foram obtidos por Cimanga et al. (2002). Estes autores estudaram a correlação entre a composição química e antibacteriana do óleo essencial de alfavaca e encontraram halos com valores de 17 mm e 12 mm para *S. aureus* e *S. Typhimurium*, respectivamente. Os valores dos halos para *S. coagulase* positiva, obtidos no presente trabalho, em ambos os métodos empregados, foram menores (14 e 15mm) que aqueles obtidos pelos autores antes citados. Entretanto, seguindo-se o critério de Pereira et al. (1999), já citado, o óleo essencial de alfavaca teve atividade antimicrobiana tanto para *S. coagulase* positiva como para *Salmonella* spp.

Em relação aos dados obtidos para a atividade antimicrobiana do óleo essencial de alfavaca frente a *S. coagulase* positiva, há uma concordância com aqueles relatados por Orafidiya et al. (2001). Estes autores estudaram a atividade do óleo essencial de alfavaca frente a *S. aureus* isolados de furúnculos, espinhas e feridas, e encontraram susceptibilidade das cepas isoladas de furúnculo frente ao óleo. Os halos de inibição mediram 16mm de diâmetro. Por outro lado, Ngassoum et al. (2003), investigando a atividade antimicrobiana desse óleo essencial frente a sete espécies de bactérias, encontraram uma inibição inferior para *S. aureus* e *E. coli*, dentre as estudadas, inferior àquela encontrada no presente trabalho.

Offiah & Chikwendu (1999) estudaram os efeitos antidiarréicos dos extratos das folhas de alfavaca em animais experimentais e os resultados dos

testes químicos revelaram que os constituintes dos extratos incluem taninos, esteróides, triterpenóides e carboidratos. Segundo os autores, o papel específico desses constituintes nos efeitos antidiarréicos não tem sido estudado. Contudo, é provável que a propriedade adstringente do tanino possa estar relacionada com o efeito antidiarréico, sendo essa a justificativa maior para o uso extensivo da planta como agente antidiarréico na medicina tradicional. Quanto à atividade antimicrobiana, Hammer et al. (1999) consideraram a alta concentração de timol presente (75%) na constituição da folha da alfavaca como o principal responsável por esta propriedade.

O óleo essencial extraído da planta pau-rosa, *Aniba duckei* K. apresentou uma significativa atividade antibacteriana frente às bactérias gram-positivas e negativas. *S. coagulase* positiva foi a espécie que apresentou mais susceptibilidade a este óleo, o que provocou um halo de 28mm (Tabela 4), quando a bactéria foi testada pelo MDRCAP (Figura 8). Oriunda da Região Amazônica esta planta apresenta grande aplicação na indústria cosmética, porém, a literatura não tem dados registrados sobre sua atividade antimicrobiana.



FIGURA 8. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de pau-rosa contra *Staphylococcus aureus*

O óleo essencial da pimenta dióica, *Pimenta dioica* L. apresentou uma alta atividade antimicrobiana contra às cepas de *E. coli* e *V. parahaemolyticus*, com medidas do halo de inibição de 23 e 22mm, respectivamente, quando usado o MDD (Tabela 3). Quando o método usado foi o MDRCAP, essa atividade foi moderada, com halos de 14 e 17 mm, respectivamente (Tabela 4).

Lopez et al. (1998) pesquisaram o extrato da pimenta dióica, *Pimenta dioica* L. e constataram seu efeito analgésico e antipirético. Os autores citam que o eugenol, composto químico que atua inibindo a liberação da prostaglandina, pode ser o responsável por sua atividade antimicrobiana.

Similar ao óleo essencial de pau-rosa, na literatura científica também há poucos relatos em relação à atividade antimicrobiana da pimenta dióica. No entanto, é sabido de sua aplicação sobre os alimentos, ressaltando-se sua utilidade na segurança alimentar (Friedman et al., 2002).

Para Wan et al. (1998), os óleos essenciais de algumas plantas com atividade antimicrobiana comprovada podem ser utilizados como alternativa natural nas lavagens de saladas frescas, substituindo o cloro.

A Tabela 5 apresenta a sensibilidade das cepas isoladas de sururu e seus respectivos controles (cepas ATCC) frente a antimicrobianos tradicionalmente utilizados. As cepas-testes de *E. coli* e seus controles apresentaram os mesmos resultados, isto é, os mesmos valores dos halos, em relação aos antimicrobianos: cloranfenicol, tetraciclina, cefoxitina, cefotaxima, excetuando-se o ácido pipemídico e gentamicina.

A cepa-teste de *Salmonella* foi sensível aos antibióticos cloranfenicol, tetraciclina, cefoxitina, cefotaxima e ácido pipemídico. A cepa padrão de *Salmonella* não foi sensível ao antimicrobiano cefotaxima.

As cepas de *S. coagulase* positiva teste e controle apresentaram halos com diferentes valores quando testadas frente a cloranfenicol, vancomicina e oxacilina. Não foi evidenciado halo de inibição para lincomicina, sulfazotrim, ampicilina e eritromicina nas cepas teste, enquanto nas cepas controle não houve inibição em relação aos dois primeiros antimicrobianos.

A cepa teste de *V. parahaemolyticus* foi sensível a cloranfenicol, tetraciclina, gentamicina, cefoxitina e ao ácido pipemídico. O comportamento das cepas teste e controle quanto a esses antimicrobianos foram semelhantes, todos apresentando susceptibilidade, mas com diferentes tamanhos dos halos.

Estes resultados diferem dos encontrados por Gonçalves (2001), o qual constatou, em experimentos, a susceptibilidade das cepas de *E. coli*, *Salmonella* spp e *S. aureus* isoladas de crustáceos e seus controles (ATCC), frente aos antibióticos cefoxitina, cloranfenicol, gentamicina e tetraciclina; ácido pipemídico, cefotaxima, tetraciclina e gentamicina, eritromicina, lincomicina, sulfatozotrim e vancomicina. No entanto, as cepas controle (ATCC) utilizadas

por este autor não foram as mesmas utilizadas na presente pesquisa. Arora & Kaur (1999) verificaram que *S. aureus* e *E. coli* mostraram sensibilidade aos antibióticos ampicilina, eritromicina, tetraciclina, gentamicina e cloranfenicol. No presente experimento, as cepas isoladas de sururu foram resistentes a esses antibióticos, exceto ao cloranfenicol, demonstrado pelo halo de inibição de 18mm de diâmetro (Tabela 5).

TABELA 5. Sensibilidade medida por meio do método de difusão de disco, das cepas isoladas de moluscos e das cepas-controle (ATCC) frente a agentes antimicrobianos comercializados

Cepas	Clo 30µg	Tet 30µg	Gen 10µg	Cfo 30µg	Ctx 30µg	Pip 20µg	Van 30µg	Lin 2µg	Sut 25µg	Oxa 1µg	Eri 10µg	Amp 10µg
<i>E. coli</i> (I)	18	12	11	18	15	20	nd	nd	Nd	nd	nd	nd
<i>E. coli</i> (ATCC)	19	12	7	18	15	16	nd	nd	Nd	nd	nd	nd
<i>Salmonella</i> spp (I)	17	16	12	21	20	22	nd	nd	Nd	nd	nd	nd
<i>Salmonella</i> (ATCC)	16	17	14	19	-	13	nd	nd	Nd	nd	nd	nd
<i>S. coagulase</i> positiva (I)	16	Nd	nd	nd	nd	nd	9	-	-	11	-	7
<i>S. aureus</i> (ATCC)	19	Nd	nd	nd	nd	nd	15	-	-	25	11	23
<i>V. parahae-molyticus</i> (I)	22	19	15	19	nd	10	nd	nd	Nd	-	nd	nd
<i>V. parahae-molyticus</i> (ATCC)	13	25	25	19	nd	15	nd	nd	Nd	-	nd	nd

Clo, cloranfenicol; Tet, tetraciclina; Gen, gentamicina; Cfo, cefoxitina; Ctx, cefotaxima; Pip, ácido pipemídico; Van, vancomicina; Lin, lincomicina; Sut, sulfazotrim; Oxa, oxacilina; Eri, eritromicina; Amp, ampicilina;

(-), sem inibição;

nd, não determinada;

I, cepa isolada do molusco.

No entanto, os resultados do presente trabalho concordam com aqueles encontrados por Lázaro et al. (1999), os quais testaram 12 antimicrobianos frente a microrganismos oriundos de fontes animais (frango, bovino, suíno e peixe) e de manipuladores de alimentos. Os autores verificaram que cepas de

E. coli isoladas dessas amostras apresentaram resistência à tetraciclina. Também há concordância com os dados apresentados por Silva & Hofer (1995). Neles, cepas de *E. coli* isoladas de peixes marinhos apresentaram alta resistência a antibióticos, inclusive a tetraciclina. Fluit et al. (2001) pesquisaram agentes antimicrobianos frente a 10 bactérias patogênicas e verificaram que mais de 50% das cepas de *E. coli* também foram resistentes a gentamicina e tetraciclina.

Também são compatíveis os dados do presente estudo com os resultados obtidos por Elgayyar et al. (2001), relativos à sensibilidade de *S. aureus* e *S. Typhimurium* aos antibióticos tetraciclina e cloranfenicol.

Segundo Kiessling et al. (2002), a salmonelose é reconhecida como uma das mais importantes causas de infecções entéricas. Os autores relatam que mais de 80% das cepas de *Salmonella* isoladas de fontes animais e humanos mostraram resistência à tetraciclina, sulfonamidas, estreptomicina e cloranfenicol. Estes resultados divergiram da presente investigação, pois a tetraciclina e o cloranfenicol apresentaram razoável atividade antimicrobiana para essa bactéria.

Em muitos surtos de infecção de origem alimentar causados por *Salmonella* spp tem-se verificado sua resistência à ampicilina e ao cloranfenicol (Holmberg et al., 1984). Duffy et al. (1999) encontraram 100% das cepas de *Salmonella* spp, isoladas de produtos cárneos que foram resistentes a um ou mais antibióticos testados nos seus experimentos.

As cepas de *V. parahaemolyticus* foram sensíveis a cloranfenicol, tetraciclina, gentamicina, cefoxitina, porém, resistentes a ácido pipemídico e oxacilina. Comparando-se as atividades antimicrobianas dos cinco óleos essenciais (Tabelas 3 e 4), verifica-se que todos apresentaram atividade para os microrganismos isolados. Resultados semelhantes foram encontrados por

Hasegawa et al. (1999), quando testaram os efeitos da planta *Wasabia japonica* em quatro cepas de *V. parahaemolyticus*.

Mesmo com o avanço da indústria farmacêutica na produção de novos antibióticos nas últimas três décadas, os problemas relacionados à resistência microbiana têm aumentado. Montelli & Levy (1991) têm mostrado a elevada incidência de resistência dos microrganismos em clínicas no Brasil.

5 CONCLUSÕES

Os moluscos bivalves (sururu) podem representar um grave risco para a saúde pública, principalmente quando capturados em estuários poluídos e conservados inadequadamente para posterior comercialização. Para os moluscos comercializados nas feiras recomenda-se um cozimento antes do consumo.

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de goiabeira, de alfavaca, de gengibre de pau-rosa e de pimenta dióica frente às cepas patogênicas *Escherichia coli*, *Salmonella spp*, *Staphylococcus* coagulase positiva e *Vibrio parahaemolyticus*, sugere que essas plantas poderiam oferecer uma alternativa natural e de baixo custo na conservação dos alimentos.

Os óleos essenciais de goiabeira, alfavaca, gengibre, pau-rosa e de pimenta dióica, os quais apresentaram grande atividade antimicrobiana, devem ser exaustivamente estudados, de modo a se conhecer o princípio ativo responsável pelas suas propriedades antimicrobianas, na perspectiva de seus usos na terapia das doenças infecciosas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEYTA, C.; DEETER, F. G.; KAYSNER, C. A.; STOTT, R. R.; WEKELL, M. M. *Campylobacter jejuni* in a Washington State shellfish growing bed associated with illness. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 56, p. 323-325, 1993.

ADAMS, M. R.; MOSS, M. O. **Food microbiology**. 2. ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2002.

AGUIAR, L. M. B. A.; MATOS, F. J. A.; MOURA, V. L. A. Atividade antibiótica de plantas medicinais da flora nordestina. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 36, n. 7, p. 547, jul. 1984.

AHMAD, I.; BEG, A. Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v. 74, n. 2, p. 113-123, Feb. 2001.

AKERELE, O. Nature's medicinal bounty: don't throw it way. **World Health Forum**, Geneva, V. 14, p. 390-395, 1993.

ALEJO, P. L. P.; LARIONOVA, I. M.; RODRÍGUEZ, G. R.; FLORES, R. M. Atividade estimulante de la fracción de saponósidos triterpénicos de la *Polyscias fruticosa* (L.) Harms (aralia) y la fracción de gingeroles del *Zingiber officinale* Roscoe (gingibre). **Revista Cubana de Plantas Medicinai**s, La Habana, v. 1, n. 4, p. 6-10, 1999.

ALI-SHTAYEH, M. S.; YAGHMOUR, R. M. R.; FAIDI, Y. R.; SALEM, K.; AL-NURI, M. A. Antimicrobial activity of 20 plants used in folkloric medicine in the Palestianian area. **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v. 60, n. 3, p. 265-271, Mar. 1998.

ALLSPICE. **Pimento, Jamaica pepper (Pimenta dioica)**. Disponível em: <<http://www.desert-tropicals.com/plants/Myrtaceae/Pimenta-dioica.html>>. Acesso em: 20 nov. 2002.

ALLSPICE. Disponível em: <<http://www.culinarycafe.com/spices-hebs/allspices.html>> Acesso em: 18 jan. 2003.

ALMEIDA, C. E.; KARNIKOWSKI, M. G. O.; FOLETO, R.; BALDISSEROTTO, B. Analysis of antidiarrhoeic effect of plants used in popular medicine. *Revista de Saúde Pública*, São Paulo, v. 29, n. 6, p. 428-433, dez. 1995.

ALZOREKY, N. S.; NAKAHARA, K. Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 80, n. 3, p. 223-230, Feb. 2003.

ANDRADE NETO, M. Volatile constituents of *Psidium pholianum* and *Psidium guyanensis*. *Journal of Essential Oils Research*, Carol Stream, v. 6, n. 3, p. 299-300, May/June 1994.

ANESINI, C. E.; PEREZ, C. Screening of plants used in Argentine folk medicine for antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, Clare, v. 39, n. 2, p. 119-128, June 1993.

ANGELILLO, I. F.; FORESTA, M. R.; SCOZZAFAVA, C.; PAVIA, M. Consumers and foodborne diseases: knowledge, attitudes and reported behavior in one region of Italy. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 64, n. 1/2, p. 161-166, Feb. 2001.

ANGELILLO, I. F.; VIGGIANI, N. M. A.; RIZZO, L.; BIANCO, A. Food handlers and foodborne diseases: knowledge, attitudes, and reported behavior in Italy. *Journal of Food Protection*, Ames, v. 63, n. 3, p. 381-385, Mar. 2000.

ANSARI, S. H.; ALI, M.; SIDDIQUI, A. A. Evaluation of chemical constituents na trade potential of *Cymbopogon citratus* (lemongrass). *Hamdard Medicus*, Karachi, v. 39, n. 1, p. 55-59, 1996.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde. Resolução n. 12 de 2 de janeiro de 2001. *Diário Oficial da União*, janeiro de 2001.

ARCHER, R. M. B.; MORETTO, E. Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* em mexilhões (*Perna perna*, Linnaeus) de banco natural do litoral do município de Palhoça, Santa Catarina-Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 3, p. 378-388, jul./set. 1994.

ARCISZ, W.; KELLY, C. B. Self purification of the soft clam *Mya arenaria*. **Public Health Reports**, Washington, v. 70, n. 6, p. 605, 1955.

ARIDOGAN, B. C.; BAYDAR, H.; KAYA, S.; DEMIRCI, M.; OZBASAR, D.; MUMCU, E. Antimicrobial activity and chemical composition of some essential oils. **Archives Pharmacal Research**, Seoul, v. 25, n. 6, p. 860-864, Dec. 2002.

ARORA, D. A.; KAUR, J. Antimicrobial activity of spices. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 12, n. 3, p. 257-262, Aug. 1999.

ATANASSOVA, V.; MEINDL, A.; RING, C. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham - a comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 68, n. 1/2, p. 105-113, Aug. 2001.

AYULO, A. M. R.; MACHADO, R. A.; SCUSSEL, V. M. Enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in fish and seafood from the southern region of Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 24, n. 1/2, p. 171-178, Dec. 1994.

AZEREDO, O. B. Instituto de óleos. **Boletim do Centro Nacional de Ensino e Pesquisas Agronômicas**, Rio de Janeiro, n. 15, p. 137-208, 1958.

BAIRD, R. M.; LEE, W. H. Media used in the detection and enumeration of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 26, n. 1, p. 15-24, nov. 1995.

BALABAN, M.; RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 61, n. 1/2, p. 1-10, Feb. 2000.

BARATTA, M. T.; DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. A.; FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, J. A.; RUBERTO, G. Antimicrobial and antioxidant properties of some comercial essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, Sussex, v. 13, n. 4, p. 235-244, July/Aug. 1998.

BARROSO, G. M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa: Imprensa Universitária, 1991. v. 2, 377 p.

BATISTA, A. P.; SILVA, G. T. F. L.; FAVERO, S. Potencial de inseticida de óleos essenciais de plantas aromáticas para a lagarta-do-cartucho-do-milho. **Academia de Ciências Biológicas da Uniderp-MS**, 2001.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, Philadelphia, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.

BELAICHE, T.; TANTAOUI-ELARAKI, A.; IBRAHIMY, A. Application of a two levels factorial design to the study of the antimicrobial activity of three terpenes. **Sciences Aliments**, Paris, v. 15, n. 6, p. 571-578, 1995.

BELL, C.; KYRIAKIDES, A. *Escherichia coli*: una aproximacion práctica al microorganismo y su control en los alimentos. Zaragoza-España: Acribia, 2000. 243 p.

BERGDOLL, M. S. Analytical methods for *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 10, n. 2, p. 91-100, Mar. 1990.

BEUCHAT, L. R. *Vibrio parahaemolyticus*: public health significance. **Food Technology**, Chicago, v. 36, n. 3, p. 80-84, Mar. 1982.

CÁCERES, A.; FLETES, L.; AGUILAR, L.; RAMIREZ, O.; FIGUEROA, L.; TARACENA, A. M. SAMAYOA, B. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. Confirmation of activity against enterobacteria of 16 plants. **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v. 38, n. 1, p. 31-38, May 1993.

CAMPOS, C. L. *Salmonella*. In: TRABULSI, L. R. **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Ateneu, 1999.

CARVALHO, C. O.; SERAFINI, A. B. Grupos de microrganismos isolados da orofaringe, nasofaringe e das mãos dos trabalhadores do Restaurante Universitário da Universidade Federal de Goiás. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 10, n. 45, p. 19-45, set./out. 1996.

CASTRO, M. M. V.; IARIA, S. T. *Staphylococcus aureus* enterotoxigênio no vestibulo de nasal de manipuladores de alimentos em cozinhas de hospitais do município de João Pessoa-PB. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 18, n. 2, p. 235-245, abr. 1984.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Salmonella**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/od/oc/media/fact/salmonella.htm>> Acesso em: 16 jul. 1999.

CIMANGA, K.; KAMBU, K.; TONA, L.; APERS, S.; DE BRUYNE, T.; HERMANS, N.; TOTTE, J.; PIETERS, L. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v. 79, n. 2, p. 213-220, Feb. 2002.

COGCO, L. G.; VÁSQUEZ, E. M.; PÉREZ, P. A.; ANDRADE, E. M. V. Sorotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud de México. **Salud Pública de México**, v. 42, n. 6, nov./dic. 2000.

COLLINS, J. E. Impact of changing consumer lifestyles on the emergence/reemergence of foodborne pathogens. **Emerging Infections Diseases**, Atlanta, v. 3, n. 4, p. 471-479, Oct./Dec. 1997.

COOK, D. W.; BOWERS, J. C.; DE PAOLA, A. Density of total and pathogenic (tdht) *Vibrio parahaemolyticus* in Atlantic and gulf coast molluscan shellfish at harvest. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 65, n. 12, p. 1873-1880, Dec. 2002.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura. Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984. v. 3, 687 p.

COSTA, A. F. *Farmacognosia*. 5. ed. Lisboa: Caloust Gulbekian, 1994. v. 1, 1031 p.

CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; MACHADO, M. I. L. *Óleos essenciais de Plantas do Nordeste*. Fortaleza: EDUFC, 1981. 210 p.

CRAWFORD, S. *Ginger*. Disponível em: <<http://www.findarticles.com/cf-dls/g2603/0003/2603000387/pl/article.html>> Acesso em: 21 mar. 2002.

CRISTINO, J. M. Correlation between consumption of antimicrobials in humans and development of resistance in bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents*, Amsterdam, v. 12, n. 3, p. 199-202, Aug. 1999.

CROCI, L.; SUFFREDINI, E.; COZZI, L.; TOTI, L. Effects of depuration of molluscs experimentally contaminated with *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* O1 and *Vibrio Parahaemolyticus*. *Journal of Applied Microbiology*, Oxford, v. 92, n. 3, p. 460-465, 2002.

D'AOUST, J. Y.; MAURER, J.; BAILER, J. S. *Salmonella* species. In: *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. 2. ed. Washington: ASM, 2001. Cap. 8, p. 141-178.

DANIELS, N. A.; MacKINNON, L.; BISHOP, R.; ALTEKRUSE, S.; RAY, B.; HAMMOND, R. M.; THOMPSON, S.; WILSON, S.; BEAN, N. H.; GRIFFIN, P. M. *Vibrio parahaemolyticus* infections in the United States, 1973-1998. *The Journal of Infections Diseases*, Chicago, v. 181, n. 5, p. 1661-1666, May 2000.

DAVEY, K. *Life on Australian seashores*. Disponível em: <<http://www.mesa.edu.au/friends/seashores/molluscs.html>> Acesso em: 17 jun. 2001.

DAVIDSON, P. M. Chemical preservatives and natural compounds antimicrobial. In: DOYLE, M. P.; BEACHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. *Food microbiology: Fundamentals na frontiers*. 2. ed. Washington: ASM, 2001. p. 593-627.

DAVIS, M. Inactivation of antibiotic and the dissemination of resistance genes. *Science*, Washington, v. 264, n. 5157, p. 375-382, Apr. 1994.

DE PAOLA, A.; KAYSNER, A.; BOWERS, J.; COOK, D. W. Environmental investigations of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters after outbreaks in Washington, Texas and New York (1997 and 1998). *Applied Environmental Microbiology*, Washington, v. 66, n. 11, p. 4649-4654, Nov. 2000.

DIAZ, C.; HOTCHKISS, J. H. Comparative growth of *Escherichia coli* O157:H7, spoilage organisms and shelf-life of shredded iceberg lettuce stored under modified atmospheres. *Journal Science Food Agriculture*, London, v. 70, n. 4, p. 433-438, Apr. 1996.

DÍAZ, L. H.; JORGE, M. R. Actividad antimicrobiana de plantas que crecen en Cuba. *Revista Cubana de Plantas Medicinai*s, La Habana, v. 2, n. 1, p. 44-47, 2001.

DIREKBUSAKAROM, S.; HERUNSALEE, A.; YOSHIMIZU, M. Efficacy of guava (*Psidium guajava*) extract against some fish and shrimp pathogenic agents. In: FLEGEL, T. W.; MAC ERA, I. H. *Diseases in Asian Aquaculture III: fish health section*. Manila, Asian Fisheries Society, 1997. p. 363.

DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. *Food Microbiology*. 2. ed. Washington: ASM, 2001.

DR MUNDI. Gengibre: uma raiz na medicina antiga. Disponível em: <http://www.drmundi.com.br/artigo_comunidadealternativa>. Acesso em: 8 mar. 2003.

DUFFY, G.; CLOAK, O. M.; SULLIVAN, M. G. O.; GUILLETA, A.; SHERIDAN, J. J.; BLAIR, I. S.; McDOWELL, D. A. The incidence and antibiotic resistance profiles of *Salmonella spp.*, on Irish retail meat products. *Food Microbiology*, London, v. 16, n. 6, p. 623-631, Dec. 1999.

DUKE, J. A. *Handbook of medicinal herbes*. Florida: CRC, 1985. p. 371.

ELGAYYAR, M.; DRAUGHON, F. A.; GOLDEN, D. A.; MOUNT, J. R. Antimicrobial activity of essential oil from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganism. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 64, n. 7, p. 1019-1024, July 2001.

ELISABETSKY, E.; BRUM, L. F. S.; SOUSA, D. O. Anticonvulsant properties of linalol in glutamate-related seizure models. **Phytomedicine**, Jena, v. 6, n. 2, p. 107-113, May 1999.

ELOFF, J. N. It is possible to use herbarium specimens to screen for antibacterial components in some plants. **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v. 67, n. 3, p. 355-360, Nov. 1999.

ESKINAZI, E.; SATO, S. Contribuição ao estudo das diatomáceas da praia de Piedade. **Instituto de Oceanografia da Universidade do Recife**, Recife, v. 5/6, p. 73-114, 1963/1964.

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

FACEY, P. C.; PASCOE, K. O.; PORTER, R. B.; JONES, A. D. Investigation of plants used in Jamaican folk medicine for antibacterial activity. **Journal of Pharmacy Pharmacology**, London, v. 51, n. 12, p. 1455-1460, Dec. 1999.

FELDHUSEN, F. The role of seafood in bacterial foodborne diseases. **Microbes and Infection**, Paris, v. 2, n. 13, p. 1651-1660, Nov. 2000.

FLUIT, A. C.; SCHMITZ, F. J.; VERHOEF, J. Multi-resistance to antimicrobial agents for the ten most frequently isolated bacterial pathogens. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 18, n. 2, p. 147-160, Aug. 2001.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 424 p.

FRANÇA, S. C. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. In: SIMÕES, C. M. O. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre-RS: UFRGS, 1999. 817 p.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Microbiologia dos alimentos. São Paulo: Atheneu, 1996. 182 p.

FRANCO, D. A.; WEBB, J.; TAYLOR, C. E. Antibiotic and sulphonamide residues in meat: implication for human health. *Journal of Food Protection*, Ames, v. 53, n. 2, p. 178-185, Feb. 1990.

FRIEDMAN, M.; HENIKA, P. R.; MANDRELL, R. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection*, Ames, v. 65, n. 10, p. 1545-1560, Oct. 2002.

FYFE, L.; ARMSTRONG, F.; STEWART, J. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis by combinations of plant oils and derivatives of benzoic acid the development of synergistic antimicrobial combinations. *International Journal Antimicrobial Agents*, Amsterdam, v. 9, n. 3, p. 195-199, Jan. 1998.

GNAN, S. O.; DEMELLO, M. T. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by aqueous goiaba extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, Clare, v. 68, n. 1/3, p. 103-108, Dec. 1999.

GONÇALVES, F. A. Atividade antibacteriana de folhas de goiabeira, *Psidium guajava* L. frente a bactérias isoladas de camarão sete barbas, *Xiphopenaeus kroyeri* (HELLER). 2001. 81 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) - Departamento de Engenharia de Pesca. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

GORMAN, R.; BLOOMFIELD, S.; ADLEY, C. C. A study of cross-contamination of food-borne pathogens in the domestic kitchen in the Republic of Ireland. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 76, n. 1/2, p. 143-150, June 2002.

GRIFFIN, M. R.; DALLEYM E.; FITZPATRICK, M.; AUSTIN, S. H. *Campylobacter gastroenteritis* associated with raw clams. **Journal of the Medical Society of New Jersey**, New Jersey, v. 80, p. 607-609, 1980.

GUENTHER, E. The essential oils. Individual essential oils of the plant families Graminae, Lauraceae, Burseraceae, Myrtaceae, Umbelliferae and Geraniaceae. New York: D. Van Nostrand, 1950. v. 4, p. 370-377.

GUERRY, P.; COLWELL, R. R. Isolation of cryptic plasmid deoxyribonucleic acid from Kanagawa-positive strains of *V. parahaemolyticus*. **Infection Immunity**, Washington, v. 16, n. 1, p. 328-334, Apr. 1977.

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

HASEGAWA, N.; MATSUMOTO, Y.; KOSHINO, A.; IWASHITA, K. Comparison of effects of *Wasabia japonica* and allyl isothiocyanate on the growth of four strains of *Vibrio parahaemolyticus* in lean and fatty treatment suspensions. **International of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 49, n. 1/2, p. 27-34, Aug. 1999.

HATHA, A. A. M.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P. Prevalence of Salmonella in fish and crustaceans from markets in Coimbatore, South India. **Food Microbiology**, London, v. 14, n. 2, p. 111-116, Apr. 1997.

HOFER, E.; SILVA, C. H. D. Isolamento e identificação de *Vibrio parahaemolyticus* de material de peixes de origem marinha. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 1974, Rio de Janeiro. Anais... Rio de Janeiro: UGF, 1979. p. 193.

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

HOLMBERG, S. D.; WELLS, J. D.; COHEN, M. L. Animal to mans transmission of antibiotic resistant *Salmonella* investigations of US outbreaks 1971-1983. **Science**, Washington, v. 225, n. 4664, p. 833-835, Aug. 1984.

HOOD, M. A.; NESS, G. E.; BLAKE, N. J. Relationship among fecal coliforms, *Escherichia coli* and *Salmonella spp* in shellfish. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 45, n. 1, p. 122-126, Jan. 1983.

LANDOLO, J. J. Genetic analysis of extracellular toxins of *Staphylococcus aureus*. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v. 43, p. 375-402, 1989.

IARIA, S. T.; FURLANETTO, S. M. P.; CAMPOS, M. L. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênico nas fossas nasais de manipuladores de alimentos em hospitais de São Paulo, 1976. *Revista de Saúde Pública*, São Paulo, v. 14, n. 1, p. 93-100, 1980.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS - ICMSF. *Técnicas de las análises microbiológicas*. Zaragoza-España: Acribia, 1983. 430 p.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS - ICMSF. *Microbiología de los alimentos: características de los patógenos microbianos*. Zaragoza-España: Acribia, 1998a. 606 p.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS - ICMSF. *Microorganismos de los alimentos 6: ecología microbiana de los produtos alimentarios*. Zaragoza-España: Acribia, 1998b. 593 p.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS - ICMSF. *Microbiología de los alimentos: características de los patógenos microbianos*. Zaragoza-España: Acribia, 1996.

IMAI, H.; OSAMA, K.; YASUDA, H.; HAMASHIMA, H.; ARAI, T.; SASATSU, M. Inhibition by the essential oils of peppermit and spearmit of the growth of pathogenic bacteria. *Microbios*, Cambridge, v. 1, n. 2, p. 31-39, Nov. 2001.

INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS – ITAL. [São Paulo], 2002. Disponível em: <<http://www.setorpesqueiro.com.br/tecnologiadealimentos/moluscos/.../microbiologia.6.sht>>. Acesso em: 12 jun. 2002.

JAIARJ, P.; KHOOHASWAN, P.; WONGKRAJANG, Y.; PEUNGVICHA, P.; SURIYAWONG, P.; SARAYA, S.; RUANGSOMBOON, O. Anticough and antimicrobial activities of *Psidium guajava* Linn. Leaf extract. **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v. 67, n. 2, p. 203-212, Nov. 1999.

JAKSIC, S.; UHITIL, S.; PETRAK, T.; BAZULIC, D.; KAROLYL, L. G. Occurrence of *Vibrio spp* in sea fish, shrimps and bivalve molluscs harvested from Adriatic sea. **Food Control**, Oxford, v. 13, n. 8, p. 491-493, Dec. 2002.

JAY, J. M. **Modern Food Microbiology**. 6. ed. Gaithersburg: Aspen, 2000.

JOLY, A. B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. 5. ed. São Paulo: Nacional, 1979.

KAMBU, K. **Eléments de phytothérapie comparée: plantas médicinales africaines**. Kinshasa: CRP, 1990.

KIESSLING, C. R.; CUTTING, J. H.; LOFTIS, M.; KIESSLING, W. M.; DATTA, A. R.; SOFOS, J. N. Antimicrobial resistance of food-related *Salmonella* isolates, 1999-2000. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 65, n. 4, p. 603-608, Apr. 2002.

KOBAYSAHI, R. Eugenol and is Eugenol dimmers as bactericides, fungicides and inflammation inhibitors. **Kibun Food Chemica Co. Japan**. JP09176074A2. jul. 8, 1997.

LAVABRE, M. **Aromaterapia: a cura pelos óleos essenciais**. 2. ed. Rio de Janeiro: Record, 1992. p. 121-123.

LAWRENCE, B. M.; REYNOLDS, J. R. Progress in essential oils. **Perfumer & Flavorist**, Carol Stream, v. 9, n. 1, p. 87-88, 1984.

LÁZARO, N. S.; FARIAS, R. S.; RODRIGUES, D. P.; HOFER, E. Enterobactereacea oriundas de fontes humana e animal: produção de enterotoxina termoestável e nível de resistência a antimicrobianos. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 14, n. 64, p. 49-56, set. 1999.

LEAL-CARSOSO, J. H.; FONTELES, M. C. Pharmacological effects of essential oils of plants of the Northeast of Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, Rio de Janeiro, v. 71, n. 2, p. 206-213, jun. 1999.

LEMONS, T. L. G.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; CRAVERO, A. A.; CLARK, A. M. Antimicrobial activity of essential oils of Brazilian plants. *Phytotherapy Research*, Sussex, v. 4, n. 2, p. 82-84, Apr. 1990.

LENETTE, E. H. *Manual of clinical microbiology*. 4. ed. Washington, D. C.: American Association for Microbiology, 1985. p. 978-987.

LIN, J.; PUCKREE, T.; MVELASE, T. P.; Anti-diarrhoeal evaluation of some medicinal plants used by Zulu traditional healers. *Journal of Ethnopharmacology*, Clare, v. 79, n. 1/2, p. 53-56, Feb. 2002.

LIMA, F. C.; OLIVEIRA, L. A. T.; MANO, S. B. Enumeração e identificação de *Vibrio parahaemolyticus* em lulas frescas comercializadas no município de Niterói-RJ. *Revista Brasileira de Ciências Veterinárias*, Rio de Janeiro, v. 1, n. 1, p. 7-11, jan./abr. 1997.

LOZOYA, X.; MECKES, M.; ABOU-ZAID, M.; TORTORIELLO, J.; NOZZOLILLO, C.; ARMASON, J. T. Quercetin glycosides in *Psidium guajava* L. leaves and determination of a spasmolytic principle. *Archives Medical Research*, Mexico, v. 25, n. 1, p. 11-15, Spring 1990.

LUTTERODT, G. D. Inhibition of gastrointestinal release of Acetylcholine by quercetin as a possible mode of action of *Psidium guajava* leaf extracts in the treatment of acute diarrhoeal disease. *Journal of Ethnopharmacology*, Clare, v. 25, n. 3, p. 235-247, May 1989.

LUTTERODT, G. D. Inhibition of microlax-induced experimental diarrhoea with narcotic-like extracts of *Psidium guajava* leaf in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, Clare, v. 37, n. 2, p. 152-157, Sept. 1992.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. *Brock biology of microorganisms*. 9. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 2000. 991 p.

MAGALHÃES, L. M. S.; ALENCAR, J. C. Fenologia do pau-rosa (*Aniba duckei* Kostermans), Lauracea, em floresta primária na Amazônia Central. *Acta Amazônica*, Manaus, v. 9, n. 2, p. 227-232, 1979.

MAGALHÃES, M.; MAGALHÃES, V.; ANTAS, M. G.; TATENO, S. Isolation of urease-positive *Vibrio parahaemolyticus* from diarrheal patients in northeast Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 263-265, 1991.

MAHMOUD, A. L. Antifungal action and antiflatoxigenic properties of some essential oil constituents. *Letters Applied Microbiology*, Oxford, v. 19, n. 2, p. 110-113, Aug. 1994.

MAHON, C. R.; MANUSELIS JR, G. *Textbook of Diagnostic Microbiology*. Philadelphia: W. B. Saunders, 1985. Cap. 3, p. 63-64.

MANZANARES, M.; MORINGO, E. M.; CORNAX, R.; BORREGO, J. J. Relationship between classical indicators and several pathogenic microorganisms involved in shellfish-borne diseases. *Journal Food Protection*, v. 9, p. 281-287, 1992.

MARSHALL, S.; CLARK, C. G.; WANG, G.; MULVEY, M.; KELLY, M. T.; JOHNSON, W. M. Comparison of molecular methods for typing *vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 37, n. 8, p. 2473-2478, Aug. 1999.

MARTÍNEZ, M. J.; MOLINA, M.; BOUCOURT, E. Evaluación de la actividad antimicrobiana del *Psidium guajava* L. (guayaba). *Revista Cubana de Plantas Medicinai*s, La Habana, v. 2, n. 1, p. 12-14, 1997.

MARTINEZ-URTAZA, J.; SACO, M.; CORDOVA, G. H.; LOZANO, A.; MARTIN, O. G.; ESPINOZA, J. Identification of *Salmonella* serovars isolated from live molluscan shellfish and their significance in the marine environment. *Journal of Food Protection*, Ames, v. 66, n. 2, p. 226-232, Feb. 2003.

MARTINS, A. P.; SLGUEIRO, L.; GONÇALVES, A.; CUNHA, P.; VILA, R.; CAMIGUERAL, S.; MAZZONI, V.; TOMI, F.; CASANOVA, J. Essential oil composition and antimicrobial activity of three Zingiberaceae from S. Tomé e Príncipe. *Planta Medica*, Stuttgart, v. 67, n. 1, p. 580-584, Jan. 2001.

MATOS, F. J. A. *Farmácia vivas*. 2. ed. Fortaleza: EUFC, 1994. 179 p.

McINGVALE, S. C.; CHEN, X. A.; McKILLING, J. L.; DRAKE, M. A. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in Luttermilk as affected by contamination point and storage temperature. *Journal of Food Protection*, Ames, v. 63, n. 4, p. 441-444, Apr. 2000.

MEAD, P. S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; McCAIG, L. F.; BREESE, J. S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. V. Food related illness and death in the United States. *Emerging infections Diseases*, Atlanta, v. 5, n. 6, p. 607-625, Nov./Dec. 1999.

MEYRAND, A. Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of Camembert – type cheeses from raw goats milk. *Journal of Applied Microbiology*, Oxford, v. 85, n. 3, p. 537-544, Sept. 1998.

MITJA, D.; VIAL-DEBAS, C.; EMPERAIRE, L. La foret en jeu. *L'extrativisme em Amazonie Centrale*. Paris: Orstom, 1996. p. 93-108.

MONTALVO, R. V.; DOMÍNGUEZ, C. C. Efecto sobre la motilidad intestinal y toxicidad aguda oral del extracto fluido de *Ocimum gratissimum* L. (orégano cimarrón). *Revista Cubana de Plantas Medicinails*, La Habana, v. 2, n. 2/3, p. 14-18, 1997.

MONTELLI, A. C.; LEVY, C. E. Aspectos relativos aos dados dos laboratórios de referência. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 197-205, 1991.

MONTVILLE, R.; CHEN, Y.; SCHAFFNER, D. W. Risk assessment of hand washing efficacy using literature and experimental data. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 73, n. 2/3, p. 305-313, Mar. 2002.

MORALES, M. A. Calcium antagonist effect of quercetin and its relation with the spasmolytic properties of *Psidium guajava* L. *Archives of Medical Research*, Mexico, v. 25, n. 1, p. 17-21, 1994.

MORALES, R. A.; THURMAN, W. N. Methods for analysing the effects of Salmonella outbreaks on poultry prices. *Prev. Vet. Met.*, Amsterdam, v. 16, p. 65-66, 1993.

MORRIS, J. G.; POTTER, M. Emergence of new pathogens as a function of change in host susceptibility. *Emerging Infections Diseases*, Atlanta, v. 3, n. 4, Oct./Nov. 1997.

MOUCHREK FILHO, V. E. Estudos analíticos e modificações químicas por metilação e acetilação do eugenol contido no óleo essencial extraído das folhas da espécie *Pimenta dioica* Lindl. 2000. 125 p. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP.

MYINTE, S. Gas chromatographic determination of eugenol in ethanol extract of cloves. *Journal of Chromatography*, Amsterdam, v. 679, n. 1/2, p. 193-195, Apr. 1996.

NAKAMURA, C. V.; NAKAMURA, T. U.; BANDO, E.; MELO, A. F. N.; CORTEZ, D. A. G.; DIAS FILHO, B. P. Antimicrobial activity of *Ocimum gratissimum* L. v. 94, n. 5, p. 675-678, 1999.

NASCIMENTO, A. R.; VIEIRA, R. H. S. F.; ALMEIDA, H. B.; PATEL, T. R.; FARIA, S. T. Survival of *Vibrio cholerae* O1 strains in shrimp subjected to freezing and boiling. *Journal of Food Protection*, Ames, v. 61, n. 10, p. 1317-1320, Oct. 1998.

NASCIMENTO, G. G. F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P. C.; SILVA, G. L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals an antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v. 31, n. 4, p. 247-256, Oct./Dec. 2000.

NGASSOUM, M. B.; ESSIA-NGANG, J. J.; TATSADJIEU, L. M.; JIROVETZ, L.; BUCHBAUER, G.; ADJOUJJI, O. Antimicrobial study of essential oils of *Ocimum gratissimum* leaves and *Zanthoxylum xanthoxyloides* fruits from Cameroon. *Fitoterapia*, Amsterdam, v. 74, n. 3, p. 284-287, Apr. 2003.

OFFIAH, V. N.; CHIKWENDU, U. A. Antidiarrhoeal effects of *Ocimum gratissimum* leaf extract in experimental animal. **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v. 68, n. 1/3, p. 327-330, Dec. 1999.

OLAJIDE, O. A.; AWE, S. O.; MAKINDE, J. M. Pharmacological studies on the leaf of *Psidium guajava*. **Fitoterapia**, Amsterdam, v. 70, n. 1, p. 25-31, Feb. 1999.

OLANO, I.; PAZ, A. E.; CERDEIRAS, M. P.; FERNANDEZ, J.; FERREIRA, F.; MOYNA, P. Screening of Uruguayan medicinal plants for antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v. 53, n. 2, p. 111-115, Aug. 1996.

OLIVEIRA, T. C. R. M.; HIROOKA, E. Y. Atualidades sobre a detecção de enterotoxinas estafilocócicas. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 121-131, jul./dez. 1996.

ORAFIDIYA, L. O.; ELUJOBA, A. A.; IWALEWA, F. O.; OREKE, I. N. evaluation of antidiarrhoeal properties of *Ocimum gratissimum* volatile oil and its activity against enteroagregative *Escherichia coli*. **Pharmacy Pharmacology Letters**, Amsterdam, v. 10, n. 1, p. 9-12, 2000.

ORAFIDIYA, L. O.; OYEDELE, A. O.; SHITTU, A. O.; ELUJOVA, A. A. The formulation of an effective topical antibacterial product containing *Ocimum gratissimum* leaf essential oil. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 224, n. 1/2, p. 177-183, Aug. 2001.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE SALUD. El agua potable y el saneamiento son esenciales para prevenir la diarrea infantil. Washington: OPS, 2003. Disponível: <<http://www.pha.org/spanish>>. Acesso em: 5 maio 2003.

OTSHUDI, A. L.; FORIERS, A.; VERCRUYSSSE, A.; ZEEBROECK, A. V.; LAUWERS, S. In vitro antimicrobial activity of six medicinal plants traditionally used for the in Democratic Republic of Congo (DCR). **Phytomedicine**, Jena, v. 7, n. 2, p. 167-172, Apr. 1999.

PAC SÁ, M.; ARNEDO, A.; BENEDICTO, J.; ARRANZ, A.; AGUILAR, V. GUILLÉN, F. Brote epidémico por *Salmonella richmond* en Castellón, España. **Revista Panamericana de la Salud Publica**, Washington, v. 3, n. 2, 1998.

PALUMBO, S. A.; CALL, J. E.; SCULTZ, F. J.; WILLIAMS, A. C. Minimum and maximum temperatures for growth and verotoxin production by hemorrhagic strains of *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection*, Ames, v. 58, n. 4, p. 352-356, Apr. 1995.

PEÑA, M. E.; IGLESIAS, A. L. H.; JIMÉNEZ, M. A. H.; MARTÍNEZ, R. B.; LEÓN, J. M.; CABELLO, F. A.; FRAUSTO, M. S.; ROSALES, S. P. Brote por *Salmonella Enteritidis* em trabalhadores de un hospital. *Salud Pública de México*, v. 43, n. 3, mayo/junio 2001.

PEREIRA, C. S.; VIANA, C. M.; RODRÍGUEZ, D. P. Enumeração e isolamento de *Vibrio parahaemolyticus* em ostras consumidas "in natura" nos restaurantes do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.ufsc.br/ccb/pdf/6.5pdf>>. Acesso em: 18 jul. 2001.

PEREIRA, M. L. ; BASTOS, E. M. A. F.; MONTEIRO, E. P.; AMÂNCIO, G. C. S.; SERRANO, A. M. Antibiotic activity of Brazilian green propolis against bacteria from human clinical etiology. In: CONGRESS APIMANDIA'99, 36., 1999, Vancouver. *Anais...* Vancouver, 1999. p. 225.

PERESI, J. T. M.; ALMEIDA, A. Z. C.; LIMA, S. I.; MARQUES, D. F.; RODRIGUES, E. C. A.; FERNANDES, S. A.; GELLI, D. S.; IRINO, K. Surto de enfermidades transmitidas por alimentos causados por *Salmonella Enteritidis*. *Revista de Saúde Pública*, São Paulo, v. 32, n. 5, p. 477-483, out. 1998.

POPOFF, M.; BOCKEMUHL, J.; BRENNER, F. W.; GHEESLING, L. L. Supplement 2000 (n. 44) to the Kauffmann-White scheme. *Research in Microbiology*, Paris, v. 152, p. 907-909, 2001.

PRATES, H. T.; LEITE, R. C.; CRAVEIRO, A. A.; OLIVEIRA, A. B. Identification of some chemical components of the essential oil from molasses grass (*Melinis minutiflora* Beauv) and their activity against Cattle tick (*Boophilus microplus*). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, São Paulo, v. 9, n. 5, p. 193-197, Sept./Oct. 1998.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. *Toxicon*, Oxford, v. 39, n. 5, p. 603-613, May 2001.

REBÊLO, J. M. M. *História natural das euglossíneas. as abelhas das orquídeas.* São Luis: Lithograf, 2001. 152 p.

ROBIN, E. H.; ANRIL, W.; ALEXANDER, M.; LOETO, N.; KEITH, K. Nasopharyngeal carriage and antimicrobial resistance in isolates of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* Type b in children under 5 years of age in Botswana. *International Journal of Infections Disease*, Amsterdam, v. 3, n. 1, p. 18-25. 1998.

RODRÍGUEZ, F. M.; TORRES, M. C. M.; PINEDO, D. M. Discriminación del tránsito intestinal en ratones por tintura de guayaba (*Psidium guajava* L.) oral. *Revista Cubana de Plantas Mediciniais*, La Habana, v. 3, n. 2, p. 54-56, 1999.

RODRÍGUEZ, M.; GARCIA, D.; GARCIA, M.; PINO, J.; HERNANDEZ, L. Antimicrobial activity of *Pimenta dioica*. *Alimentaria*, Madrid, v. 34, n. 274, p. 107-110, 1996.

RODRÍGUEZ, M. G. Q.; SARRÍA, F. B.; VALCÁRCEL, A. C.; SALVADO, A. C. Uso de la crema repelente de *Pimenta dioica* por combatientes de una unidad militar. *Revista Cubana de Medicina Militar*, La Habana, v. 26, n. 2, p. 94-97, 1997.

ROITMAN, I.; TRAVASSOS, L. R.; AZEVEDO, J. L. *Tratado de Microbiologia*. [S. l.]: Manole, 1988.

ROMALDE, J. L. Moluscos bivalves: implicações de la contaminación viral de moluscos para la salud pública. Disponível em: <<http://www.consumaseguridad.com/investigacion>>. Acesso em: 28 ago. 2002.

SADDIK, M. F.; EL-SHERBEENY, M. R.; MOUSA, B. M.; EL-AKKAD, A.; BRYAN, F. L. Microbiological profiles and storage temperatures of Egyptian fish and other sea foods. *Journal of Food Protection*, Ames, v. 48, n. 5, p. 403-406, May 1985.

SALVAT, A.; ANTONNACI, L.; FORTUNATO, R. H.; SUAREZ, E. Y.; GODOY, H. M. Screening of some plants from Northern Argentina for their antimicrobial activity. *Letters in Applied Microbiology*, Oxford, v. 32, n. 5, p. 293-297, May 2001.

SCHLIMME, D. V. Marketing lightly processed fruits and vegetables. *HortScience*, Alexandria, v. 30, n. 1, p. 15-17, Feb. 1995.

SHEEHAN, D.; POWER, A. Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve mollusc. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, Oxford, v. 123, n. 3, p. 193-199, July 1999.

SILVA, A. A. L.; HOFER, E. *Escherichia coli* from salt-water fish: resistance to drugs and colicinogeny. *Biomedical Letters*, Cambridge, v. 51, p. 175-181, 1995.

SINHÁ, G. K.; GULATI, B. C. Antibacterial and antifungal study of some essential oils and some of their constituents. *Indian Perfumer*, Carol Stream, v. 34, n. 2, p. 126-129, 1990.

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*, Oxford, v. 26, n. 2, p. 118-122, Feb. 1998.

SOARES, M. J.; TOKUMARU-MIYAZAKI, N. H.; NOLETO, A. L.; FIGUEIREDO, A. M. Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* clones and detection of Brazilian epidemic MRSA clone (III::B:A) among isolates from food handlers. *Journal of Medical Microbiology*, Philadelphia, v. 46, p. 214-221, 1997.

SOSA, A. Resistência a antibióticos em Latino América. Boston: APUA, 1999. Disponível em: <<http://www.healthsci.tufts.edu/apua/chapters/Latin/Am.article1.html>>. Acesso em: 31 out. 2001.

SRINIVASAN, D.; NATHAN, S.; SURESH, T.; PERUMALSAMY, P. L. Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, Clare, v. 74, p. 217-220. 2001.

SUGAWARA, Y.; HARA, S.; TAMURA, K.; FUJII, T.; NAKAMURA, K.; MASUJIMA, T.; AOKI, T. Sedative effect on humans of inhalation of essential oil of linalool: sensory evaluation and physiological measurements using optically active linalools. *Analytica Chimica Acta*, Amsterdam, v. 365, n. 1/3, p. 293-299, June 1998.

SVOBODA, K. P.; HAMPSON, J. B. Bioactivity of essential oils of selected temperature aromatic plants: antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory and other related pharmacological activities. 1999.

TARR, P. I.; TRAN, N. T.; WILSON, R. A. Escherichia coli O157:H7 in retail ground beef in Seattle: results of a one-year prospective study. *Journal of Food Protection*, Ames, v. 62, n. 2, p. 133-139, Feb. 1999.

TAUXE, R. V. Emerging foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 78, n. 1/2, p. 31-41, Sept. 2002.

THRELFALL, E. J.; WARD, L. R.; FROST, J. A.; WILLSHAW, G. A. The emergence and spread of antibiotic resistance in food-borne bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 62, n. 1/2, p. 1-5, Dec. 2000.

TONA, L.; KAMBU, K.; NGIMBI, N. MESIA, K.; PENGE, O. LUSAKIBANZA, M. Antiamoebic and phytochemical screening of some Congolese medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, Clare, v. 61, n. 1, p. 57-65, May 1998.

TWEDT, R. M. *Bacteriological analytical manual*. 6. ed. Arlington: Association of Official Chemists. Recovery of *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic vibrios, 1984. Cap. 12.

TYRREL, M. H. Evolution of natural development with the assistance of modern technologies. *Food Technology*, Chicago, p. 68-72, 1990.

VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. F. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 3. ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 1992.

VANTARAKIS, A.; KOMNINO, G.; VENIERI, D.; PAPAPETROPOULOU, M. Development of multiplex PCR detection of Salmonella spp and Shigella spp in mussels. *Letters in Applied Microbiology*, Oxford, v. 31, p. 105-109, 2000.

VIEIRA, A. M. Pesquisas Florestais. *Boletim do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia*, Manaus, v. 14, p. 1-15, 1979.

VIEIRA, R. H. S. F. Aspectos microbiológicos do pescado antes e depois de processado. Fortaleza: LOBOMAR, 1989.

VIEIRA, R. H. S. F.; IARIA, T. S. *Vibrio parahaemolyticus* in lobster *Panulirus laevis* (Latreille). *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 16-21, jan./mar. 1993.

VIEIRA, R. H. S. F.; RODRIGUES, D. P.; GONÇALVES, F. A.; GONÇALVES, F. A.; MENEZES, F. G. R.; ARAGÃO, J. S.; SOUSA, O. V. Microbicidal effect of medicinal plant extracts (*Psidium guajava* LINN and *Carica Papaya* LINN) upon bacteria isolated from fish muscle and known to induce diarrhea in children. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*. São Paulo, v. 43, n. 3, p. 145-148, 2001.

WAN, J.; WILCOCK, A.; COVENTRY, M. J. The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Applied Microbiology*, Oxford, v. 84, n. 2, p. 152-158, Feb. 1998.

YUNES, R. A.; PEDROSA, C. R.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. *Química Nova*, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 147-152, jan./fev. 2001.