Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Potencial antimicrobiano de resíduos agroindustriais sobre *Listeria monocytogenes*

Cristina Bani Corrêa

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2011

Cristina Bani Corrêa
Engenheira de Alimentos

Potencial antimicrobiano de resíduos agroindustriais sobre *Listeria monocytogenes*

Orientador:
Prof. Dr. **ERNANI PORTO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP

Corrêa, Cristina Bani
Potencial antimicrobiano de resíduos agroindustriais sobre *Listeria Monocytogenes* / Cristina Bani Corrêa. - - Piracicaba, 2011.
85 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011.

1. Agentes antimicrobianos 2. Compostos fenólicos 3. Contaminação de alimentos 4. Indústria agrícola 5. Listeria 6. Metabólitos secundários 7. Resíduos industriais I. Título

CDD 576.163
C824c

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

A Deus, a quem devo tudo.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que está ao meu lado em todos os momentos e sem Ele eu nada poderia fazer.

À minha família. Aos meus pais Maria e Robson pela dedicação e amor. À minha tia Zulmira por todo o seu carinho e preocupação, como uma mãe está sempre cuidando de mim.

Um agradecimento especial à minha irmã Cristiane e ao meu cunhado Délcio, que foram muito importantes nesta fase da minha vida. Compartilharam comigo momentos difíceis, me ajudaram a vencer muitos desafios e estiveram sempre ao meu lado me aconselhando e incentivando.

Ao meu querido filho Igor, pelo amor e compreensão. Agradeço a Deus por me proporcionar a alegria de ter você ao meu lado.

Ao meu orientador, Professor Drº Ernani Porto, pela orientação, ensinamentos e pelas palavras de apoio. Expresso minha gratidão.

À pesquisadora Virgínia Martins da Matta, pela orientação e iniciação na vida acadêmica. Obrigado por tudo o que me ensinou.

Ao professor Severino Matias de Alencar pela atenção e apoio na realização deste trabalho e por disponibilizar as instalações do laboratório de Bioquímica para a realização de parte dos experimentos.

Às pesquisadoras Andrea Henriques Pons e Claudia Coutinho, da Fundação Oswaldo Cruz, pela realização da análise de Citometria de fluxo.

Aos professores do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição pela dedicação e contribuição na minha formação científica.

Aos professores da UFRRJ por todo o conhecimento transmitido, sendo de fundamental importância para a minha formação profissional.

À Denise, técnica do Laboratório de Higiene e Laticínios, pela amizade e carinho.

Aos funcionários do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, pelo apoio e colaboração durante a execução deste trabalho, em especial à Rose, à Bia e ao Fábio.

Aos meus queridos amigos Zilmar, Vânia, Suelen e Conan pelo constante apoio e amizade.

Aos colegas do Laboratório de Higiene e Laticínios Nicolle, Giovana, Lígia, Laura e José Guilherme.

Às meninas do Laboratório de Bioquímica Keityane, Adna e Priscilla, e à técnica Ivani por me auxiliarem na liofilização das amostras e na realização da análise de espectrometria de massas.

À CAPES, pela bolsa concedida.

“Nunca me deixes esquecer
que tudo o que tenho,
tudo o que sou,
o que vier a ser,
vem de Ti Senhor.”

Vem De Ti, Senhor.
Diante do Trono - Ana Paula Valadão

SUMÁRIO

RESUMO 11
ABSTRACT 13
LISTA DE FIGURAS 15
LISTA DE TABELAS 17
1 INTRODUÇÃO 19
2 DESENVOLVIMENTO 21
2.1 Revisão Bibliográfica 21
2.1.1 Produção de frutas e hortaliças no Brasil 21
2.1.2 Reutilização de resíduos agroindustriais 22
2.1.3 Mecanismos de defesa vegetal 23
2.1.4 Glucosinolatos 26
2.1.5 Compostos Fenólicos 27
2.1.5.1 Ácidos fenólicos 28
2.1.5.2 Flavonóides 30
2.1.5.3 Taninos 31
2.1.6 Atividade antibacteriana de compostos de origem vegetal 32
2.1.7 *Listeria monocytogenes* 34
2.1.8 Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* 36
2.1.8.1 Teste de difusão 36
2.1.8.2 Concentração inibitória mínima 37
2.1.9 Citometria de fluxo 38
2.2 Materiais e métodos 41
2.2.1 Obtenção dos resíduos agroindustriais 41
2.2.2 Preparo dos extratos 43
2.2.3 Obtenção da cepa de *Listeria monocytogenes* e preparo do inóculo 46
2.2.4 *Screening* da atividade antimicrobiana dos resíduos agroindustriais 46
2.2.4.1 Teste de difusão em Ágar 47
2.2.5 Microtécnica para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos 47

2.2.6 Citometria de fluxo 48
2.2.6.1 Preparo do inóculo 48
2.2.6.2 Preparo dos extratos 48
2.2.6.3 Análise das amostras por citometria de fluxo 49
2.2.7 Composição química dos extratos 51
2.2.7.1 Remoção de interferentes das amostras por meio da técnica SPE (Solid Phase Extration) 51
2.2.7.2 Derivatização – formação de derivados do trimetilsilil (TMS) 52
2.2.7.3 Cromatografia gasosa com espectrometria de massa (CG-EM) 53
2.3 Resultados e Discussão 53
2.3.1 Resultados 53
2.3.2 Teste de difusão em ágar 53
2.3.3 Microtécnica para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) 55
2.3.4 Citometria de fluxo 57
2.3.5 Composição química dos extratos por CG-EM 67
2.3.6 Discussão 71
3 CONCLUSÕES 75
REFERÊNCIAS 77

RESUMO

Potencial antimicrobiano de resíduos agroindustriais sobre *Listeria monocytogenes*

Os compostos fenólicos e os glucosinolatos vêm sendo pesquisados quanto à atividade antimicrobiana contra diversos microrganismos patogênicos, dentre eles a *Listeria monocytogenes*, um perigoso contaminante de alimentos. Este trabalho teve como objetivo principal avaliar resíduos agroindustriais com atividade contra *Listeria monocytogenes*, bem como identificar a composição química, visando a aplicação na indústria de alimentos. Neste trabalho foram analisados 23 resíduos agroindustriais. Os extratos destes resíduos foram preparados a partir de cinco solventes (hexano; clorofórmio; acetato de etila; etanol:água (80:20 v/v) e água), os quais foram utilizados na avaliação do potencial antimicrobiano contra *Listeria monocytogenes* por meio do teste de difusão em ágar. Os extratos que apresentaram resultado positivo foram selecionados para as análises de Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM), citometria de fluxo e composição química por CG-EM. A *L. monocytogenes* mostrou-se sensível apenas aos extratos aquosos de talo de brócolis e casca de abóbora moranga e extrato clorofórmico de semente de mamão apresentando valores de CIM de 102,4 mg/mL, >102,4 mg/mL e de 6,4mg/mL, respectivamente. A análise de citometria de fluxo demonstrou alterações na morfologia das células, frente aos extratos testados. A principal ação dos extratos foi em função da inibição do crescimento do microrganismo e da redução de sua população. Os extratos apresentaram uma composição química peculiar. Nos extratos de talo de brócolis e casca de abóbora foram encontrados alguns ácidos fenólicos e orgânicos, enquanto que no extrato de semente de mamão o único composto encontrado com potencial antimicrobiano foi o benzil-isotiocianato. Diante da dificuldade em evitar a contaminação de alimentos por *L. monocytogenes*, a utilização de compostos antimicrobianos naturais derivados de resíduos agroindustriais se mostra promissora e pode ser uma alternativa para auxiliar na segurança dos alimentos.

Palavras-chave: *Listeria monocytogenes*; Resíduos agroindustriais; Antimicrobianos naturais

ABSTRACT

Antimicrobial potential of agroindustrial residues on *Listeria monocytogenes*

The phenolic compounds and glucosinolates have been investigated for their antimicrobial activity against several pathogenic microorganisms, including *Listeria monocytogenes,* a dangerous contaminant of food. This study has as main objective valuate agroindustrial residues with activity against *Listeria monocytogenes,* well as evaluate the chemical composition, aimed at their application in food industry. In this work we analyzed 23 agroindustrial residues. The extracts of these residues were prepared from five solvents (hexane, chloroform, ethyl acetate, ethanol:water (80:20 v/v) and water), which were used in evaluating the antimicrobial potential against Listeria monocytogenes by the agar diffusion test. The extracts that tested positive were selected for analysis of Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Bactericidal Concentration (MBC), flow cytometry and chemical composition by GC-MS. *L. monocytogenes* showed sensibility only to aqueous extracts of stalk of broccoli and peel pumpkin and chloroform extract of papaya seed showing MIC values of 102.4 mg / mL,> 102.4 mg / mL and 6.4 mg / mL, respectively. The flow cytometry analysis showed changes in cell morphology, front of to tested extracts. The main action of the extracts was as a function the inhibition of growth of microorganisms and reducing its population. The extracts showed a peculiar chemical composition. In extracts of broccoli stalks and peel pumpkin were found some phenolic acids and organic, while the extract in papaya seed found the single compound with antimicrobial potential was benzyl-isothiocyanate. Given the difficulties in preventing food contamination by *L. monocytogenes*, the use of natural antimicrobial compounds derived from agroindustrial residues shows promise and can be an alternative to aid in safety of food.

Keywords: *Listeria monocytogenes*; Agroindustrial waste; Natural antimicrobials

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Glucosinolatos e seus produtos de hidrólise 26
Figura 2 - Estruturas de ácidos hidroxibenzóicos 28
Figura 3 - Estruturas de ácidos hidroxicinâmicos 29
Figura 4 - Estrutura básica dos Flavonóides 30
Figura 5 - Esquema do funcionamento de um citômetro de fluxo..... 39
Figura 6 - Representação esquemática da ligação dos fluorocromos cFDA (A) em uma célula viável e PI (B) em uma célula danificada 41
Figura 7 - Fluxograma geral de extração..... 45
Figura 8 - Representação esquemática da análise de citometria de fluxo após o tratamento com os extratos. Gráfico representando diferenças de FSC (Tamanho) por SSC (Granulosidade) de *Listeria monocytogenes* nas regiões R1, R2 e R3 (A). Gráfico representando área por largura de fluorescência em FL2 da população de *L. monocytogenes* da região R3 (B). Gráfico de fluorescência representando as marcações dos fluorocromos cFDA em FL1 e PI em FL2 da região R4 (C)..... 50
Figura 9 - Teste de difusão em ágar do extrato aquoso de talo de brócolis (T.B.) (A), extrato aquoso de casca de abóbora moranga (C.A.) (B) e extrato clorofórmico de semente de mamão (S.M.) 55
Figura 10 - Método de microdiluição em caldo para a avaliação da atividade antimicrobiana (CIM) dos resíduos agroindustriais contra *Listeria monocytogenes*..... 57
Figura 11 - Gráficos de tamanho (FSC) por granulosidade (SSC) de *Listeria monocytogenes* ATCC7644. Solução salina (A), Tween a 0,04% (B), clorexidina a 0,12%(C), semente de mamão C1 (D), talo de brócolis (E) e casca de abóbora (F). As regiões marcadas com as cores vermelha, verde e azul representam as regiões R1, R2 e R3 respectivamente 58

Figura 12 - Representação das regiões R1+R2 (A) e R3 (B) dos gráficos de tamanho por granulosidade de *Listeria monocytogenes* ATCC7644 após tratamento com semente de mamão C1 (S.M.C1), semente de mamão C2 (S.M.C2), semente de mamão C3 (S.M.C3), casca de abóbora (C.A.) e talo de brócolis (T.B.) em 1, 3 e 5 horas 60

Figura 13 - Gráficos de fluorescência de FL1 (cF) por FL2 (PI) de *Listeria monocytogenes* ATCC7644, após tratamento com semente de mamão C1 (C, H, M), semente de mamão C2 (D, I, N), semente de mamão C3 (E, J, O), casca de abóbora (F, K, P) e talo de brócolis G, L, Q) em 1, 3 e 5 horas. Solução salina (A); aquecimento a 70^0C por 30 minutos (B)..... 62

Figura 14 - Gráficos de fluorescência de FL1 (cF) por FL2 (PI) de *Listeria monocytogenes* ATCC7644 após tratamento com semente de mamão C1 (A e B), semente de mamão C2 (C e D), casca de abóbora (E-G) e talo de brócolis (H-J) em 1, 3 e 5 horas 64

Figura 15 - Gráfico de fluorescência cF por PI da população total de *Listeria monocytogenes* ATCC7644 após tratamento com semente de mamão C1 (A), semente de mamão C2 (B), semente de mamão C3 (C), casca de abóbora (D) e talo de brócolis (E) em 1, 3 e 5 horas..... 66

Figura 16 - Efeito dos extratos sobre a atividade da enzima esterase de *Listeria monocytogenes* ATCC7644 67

Figura 17 - Perfil cromatográfico do extrato aquoso de talo de brócolis 68

Figura 18 - Perfil cromatográfico do extrato aquoso de casca de abóbora 69

Figura 19 - Perfil cromatográfico do extrato clorofórmico de semente de mamão . 70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Produção agrícola de algumas frutas e hortaliças no ano de 2009.....22
Tabela 2 - Mecanismos de resistência bioquímica das plantas 24
Tabela 3 - Resíduos agroindustriais utilizados na determinação da atividade antibacteriana.....43
Tabela 4 - Designação das áreas de células marcadas com cF e PI.....51
Tabela 5 - Diâmetros dos halos de inibição obtidos pelo método de difusão em ágar frente à *Listeria monocytogenes* 54
Tabela 6 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos frente à *Listeria monocytogenes*.....55
Tabela 7 - Análise da região R3 do gráfico tamanho por granulosidade de *Listeria monocytogenes* ATCC7644 nos diferentes extratos.....59
Tabela 8 - Tempo de retenção, porcentagem dos compostos e íons do espectro de massas dos principais compostos silanizados presentes no extrato aquoso de talo de brócolis pela análise de CG-EM.....69
Tabela 9 - Tempo de retenção, porcentagem dos compostos e íons do espectro de massas dos principais compostos silanizados presentes no extrato aquoso de casca de abóbora pela análise de CG-EM 70
Tabela 10 - Tempo de retenção, porcentagem dos compostos e íons do espectro de massas dos principais compostos silanizados presentes no extrato clorofórmico de semente de mamão pela análise de CG-EM ..71

1 INTRODUÇÃO

O Brasil, por ser um país de grande atividade agrícola, é um dos que mais produzem resíduos agroindustriais. Produtores e indústrias enfrentam o problema de descarte da biomassa residual que, embora seja biodegradável, necessita de um tempo mínimo para ser mineralizada, constituindo-se numa fonte de poluentes ambientais (GUERRERO; BRITO, 1995). O uso de resíduos agrícolas como substratos aplicáveis em diversas áreas, além de poder ser economicamente viável, pode ajudar a resolver os problemas ambientais decorrentes do seu acúmulo na natureza (ATLAS DE ENERGIA ELÉTRICA DO BRASIL, 2008; ALEXANDRINO et al., 2007; KAUR et al., 2008).

Durante o seu desenvolvimento, as plantas sintetizam compostos caracterizados como metabólitos secundários, que desempenham um papel importante na proteção das plantas contra uma série de fatores externos (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; PASCHOLATI, 2008). Entre os diversos compostos metabolizados estão os compostos fenólicos e os glucosinolatos, estes últimos presentes apenas em algumas famílias de vegetais como a família *Brassicaceae* e *Caricaceae* (NIELSEN; RIOS, 2000; FAHEY; ZALCMANN; TALALAY, 2001; NAKAMURA et al., 2007). Estes compostos e seus produtos de hidrólise têm sido vastamente explorados como antioxidantes naturais, estando também em evidência como substâncias com propriedades antimicrobianas (LUCIANO et al., 2008; SHIN; MASUDA; NAOHIDE, 2004; WEN et al., 2003; BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006). Os subprodutos agroindustriais são boas fontes destes compostos e abrem espaço para uma série de perspectivas, principalmente para sua aplicação na indústria de alimentos.

No grupo dos compostos fenólicos, são explorados os ácidos fenólicos, os flavonóides e os taninos, e dos derivados dos glucosinolatos, os isotiocianatos são os mais difundidos com potencial antimicrobiano (AYAZ et al., 2008; BAYDAR; ÖZKAN; SAĞDIÇ, 2004; BLAŽEVIĆ et al., 2010). A atividade antimicrobiana desses compostos tem sido demonstrada contra uma variada gama de bactérias e o mecanismo de ação proposto pode ser o resultado da habilidade desses compostos em formar combinações capazes de alterar a permeabilidade celular microbiana, acarretando a perda de

macromoléculas do seu interior e/ou podem também interagir com proteínas da membrana causando uma deformação em sua estrutura e funcionalidade (LÓPEZ-MALO VIGIL; PALOU; ALZAMORA, 2005; KIM et al., 1995).

A *Listeria monocytogenes* é uma bactéria que cresce sob temperatura de refrigeração (4° a 10°C) e é o agente etiológico da listeriose, uma severa infecção alimentar (LORBER, 2007). A bactéria atinge principalmente pessoas com o sistema imunológico comprometido ou ainda em desenvolvimento e qualquer alimento de origem vegetal ou animal pode apresentar quantidade variada dessa bactéria (BUCHOLZ; MASCOLA, 2001; JAY, 2005; SMITH et al., 2003). A *Listeria* pode contaminar saladas, pratos prontos para o consumo e até alimentos refrigerados. Em diversos países foram relatados vários casos que resultaram em infecção invasiva, tendo como veículos o leite, queijo fresco, manteiga, truta defumada, produtos feitos de carne de porco prontos para o consumo, dentre outros (FLEMING et al., 1985; MACDONALD et al., 2005; LYYTIKAINEN et al., 2000; MIETTINEN et al. 1999; GOULET et al., 1998).

Este trabalho tem como objetivo principal identificar resíduos agroindustriais com atividade contra *Listeria monocytogenes*, bem como identificar a composição química, visando aplicação na indústria de alimentos.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 Produção de frutas e hortaliças no Brasil

O Brasil é um dos três maiores produtores de frutas do mundo. Sua produção superou 43 milhões de toneladas em 2008, representando 5% da produção mundial (SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS - SEBRAE, 2009). Na região Sudeste destaca-se o Estado de São Paulo, como um forte produtor de laranja, que além de atender o mercado nacional também fornece a fruta para a exportação. O Sul se destaca na produção de uva, com evidência para o Rio Grande do Sul como principal produtor, e maçã, onde Santa Catarina lidera o *ranking* nacional de produção da fruta. Na região Nordeste o agronegócio se sobressai com a produção de variedades de frutas como banana, manga, uva, melão, abacaxi e mamão e no Norte o destaque são as frutas nativas da Amazônia, onde o açaí é a fruta em maior evidência (ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA, 2010).

O setor de hortaliças no Brasil se desenvolveu rapidamente na última década, chegando a uma produção de 19,3 milhões de toneladas em 2008. A produção se concentra em grande parte, nas regiões Sudeste e Sul, com 75% do total. Os outros 25% estão distribuídos no Nordeste e no Centro-Oeste. A produção mundial de hortaliças ocupa uma área de aproximadamente 89 milhões de hectares, com volume total de 1,4 bilhões de toneladas (ANUÁRIO BRASILEIRO DE HORTALIÇAS, 2010). A tabela 1 apresenta a produção de algumas frutas e hortaliças no ano de 2009.

Tabela 1 - Produção agrícola de algumas frutas e hortaliças no ano de 2009

Produtos	Produção (milhões de toneladas)
Banana	7,193
Batata inglesa	3,434
Cebola	1,412
Laranja	18,340
Maçã	1,052
Mamão	1,8
Tomate	4,204
Uva	1,345

Fonte: INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE (2010), ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA (2010).

Segundo dados da Embrapa Hortaliças, do total de hortaliças produzidas no Brasil, são desperdiçados em média entre 35% a 40% pós-colheita, enquanto nos Estados Unidos estas perdas não passam de 10% (VILELA et al., 2000).

Através do consumo diário e do processamento de frutas e hortaliças, são gerados muitos resíduos (folhas inadequadas para o uso, talos, cascas, sementes e borra do processo industrial) que são descartados como lixo comum ou são direcionados para fabricação de ração animal ou adubo. Os resíduos de frutas e hortaliças podem ser utilizados como matéria prima para novas tecnologias, resultando em redução das perdas, gerando mais receitas e melhorando a qualidade de vida da população.

2.1.2 Reutilização de resíduos agroindustriais

Nos últimos anos há um crescente interesse no reaproveitamento de resíduos agroindustriais. Alguns processos já são aplicados para a exploração de resíduos agroindustriais, como por exemplo, a sua utilização na alimentação animal ou como fertilizante, porém o custo de secagem e transporte são fatores economicamente limitantes (GUERRERO; BRITO, 1995).

Diversas pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de utilizar estes materiais como substratos para a produção de substâncias com alto valor agregado, tais como: combustíveis, ácidos orgânicos, enzimas e compostos com propriedades antioxidantes (ATLAS DE ENERGIA ELÉTRICA DO BRASIL, 2008; ALEXANDRINO et al., 2007; KAUR et al., 2008).

Alguns compostos com propriedades antioxidantes podem ser utilizados como conservantes de alimentos (substâncias antimicrobianas), sendo capazes de impedir o crescimento de microrganismos patogênicos causadores de sérias infecções de origem alimentar (AYAZ et al., 2008; LUCIANO et al., 2008; XIA et al., 2010). A utilização eficiente desses resíduos é importante uma vez que pode gerar empregos, agregar valor aos subprodutos agroindustriais e prevenir problemas de poluição ambiental.

2.1.3 Mecanismos de defesa vegetal

Para se proteger do ataque de patógenos as plantas utilizam sistemas de defesa que englobam mecanismos físicos e bioquímicos para combater o agente agressor. Esses compostos fazem parte do metabolismo secundário das plantas e são sintetizados através de rotas metabólicas variadas com o objetivo de atuar rapidamente na proteção da planta contra o ataque do patógeno (HARBORNE; WILLIAMS, 2000).

Os compostos provenientes do metabolismo secundário desempenham um papel importante na proteção das plantas e estão também relacionados com a interação das plantas com o meio ambiente. Desta forma alguns desses compostos atuam na proteção contra fatores bióticos e abióticos, e podem também estar relacionados com a atração de agentes polinizadores e dispersores de sementes (LO; NICHOLSON; TREMACOLDI, 2008). Esses compostos distribuem-se nos tecidos da planta, em geral, dentro dos vacúolos ou podem ser formados imediatamente em resposta a um ataque específico (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; PASCHOLATI, 2008).

A resistência da planta ao ataque de um microrganismo patogênico pode ser entendida como a capacidade da planta de atrasar ou evitar o desenvolvimento do patógeno em seus tecidos (GOODMAN et al., 1986). Essa resistência envolve a apresentação de um sistema de defesa contra o ataque do invasor abrangendo

mecanismos estruturais (barreiras físicas) e bioquímicos (liberação de substâncias) que irão atuar de maneira dinâmica para tentar impedir o desenvolvimento do patógeno ou gerar condições adversas para a sua sobrevivência nos tecidos do hospedeiro (MISAGHI, 1982).

A planta pode apresentar em seus tecidos sadios, substâncias armazenadas em altas concentrações, durante todo o seu crescimento e desenvolvimento, podendo se converter em substâncias altamente tóxicas com o início da infecção (mecanismos bioquímicos pré-formados) ou ainda, sintetizar substâncias em resposta a um ataque, infecção ou injúria, sendo uma resposta temporária de proteção (mecanismos bioquímicos pós-formados) (GATEHOUSE, 2002). Os mecanismos de resistência bioquímica das plantas estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2 - Mecanismos de resistência bioquímica das plantas

Mecanismo de resistência bioquímico	Compostos
Pré-formados	Fenóis
	Alcalóides glicosídicos
	Lactonas insaturadas
	Glicosídeos fenólicos
	Glicosídeos cianogênicos
	Inibidores protéicos
	Fototoxinas
	Quitinases
	β-1,3 glucanases
Pós-formados	Fitoalexinas
	Proteínas relacionadas á patogênese
	Espécies ativas de oxigênio
	Fototoxinas

Fonte: SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; PASCHOLATI (2008).

A resposta de resistência da planta varia de acordo com o agente patogênico e, diante deste patógeno, pode variar em função da idade da planta hospedeira, do órgão e/ou tecido afetado, do estado nutricional e das condições ambientais (LO; NICHOLSON; TREMACOLDI, 2008).

Alguns compostos de defesa (contra um patógeno específico) podem estar presentes apenas em uma região da planta. Um exemplo disto é a antracnose em cebolas. Walker (1921), em seus estudos, mostrou que cebolas brancas são susceptíveis ao fungo *Colletotrichum circinans* enquanto as cebolas que apresentam coloração amarela ou avermelhada são resistentes ao ataque do fungo. Estudos posteriores revelaram a presença do ácido protocatecóico, na forma livre, nas cebolas coloridas (amarelas e avermelhadas) (LINK; ANGEL; WALKER, 1929).

Outros compostos podem ser encontrados em algumas plantas em altas concentrações apenas durante uma fase da vida da planta como, por exemplo, durante o amadurecimento dos tecidos. Este fato ocorre com a presença do ácido cíclico hidroxâmico em milho que é elevada durante a fase de desenvolvimento da planta, porém diminui com o passar do tempo, não sendo encontrado nos tecidos amadurecidos. Este composto está relacionado com a resistência do milho a vários fungos durante o crescimento da planta (LYONS; NICHOLSON, 1989 apud PASCHOLATI, 2008).

Dentre os mecanismos de resistência bioquímica pós-formados, é importante destacar a natureza química das fitoalexinas. As fitoalexinas são metabólitos secundários produzidos pelas plantas em resposta a estresses físicos, químicos ou biológicos. O conceito de fitoalexina é na realidade funcional, pois estas substâncias pertencem a diferentes classes de metabólitos secundários (terpenos, flavonóides, dihidrofenantrenos, cumarinas, alcalóides e etc). Uma mesma substância pode ou não ser considerada fitoalexina, pois depende se sua síntese é induzida pela presença do patógeno ou se sua ocorrência é verificada como um metabólito constitutivo, acumulado normalmente pela planta sadia. Desta forma, uma substância pode ser um metabólito constitutivo para uma espécie e pode ser encontrada em outra como fitoalexina (BRAGA, 2008).

Alguns dos compostos liberados através dos mecanismos bioquímicos de defesa das plantas têm sido pesquisados com o objetivo de se isolar compostos com potencial atividade antimicrobiana contra uma variada gama de microrganismos patogênicos. Dentre eles destacam-se os glucosinolatos e os compostos fenólicos.

2.1.4 Glucosinolatos

Os glucosinolatos são ânions orgânicos contendo glicose e enxofre formando um tioglicosídeo ligado a uma cadeia lateral (grupo R) derivada de aminoácidos. Estão separados fisicamente da enzima mirosinase (tioglucosídeo glucohidrolase, EC 3.2.3.1), uma classe de enzimas responsáveis pela sua hidrólise. O contato entre a enzima e os glucosinolatos pode ocorrer devido à lesão física do tecido vegetal ou pelo seu processamento para uso na alimentação (corte, mastigação, agitação, cozimento e congelamento/degelo). Com a hidrólise e/ou degradação térmica dos glucosinolatos vários produtos são formados, entre eles os isotiocianatos, as nitrilas, os tiocianatos, as epitionitrilas e as oxazolidina-tionas (Figura 1) (FAHEY; ZALCMANN; TALALAY, 2001; VIG et al., 2009).

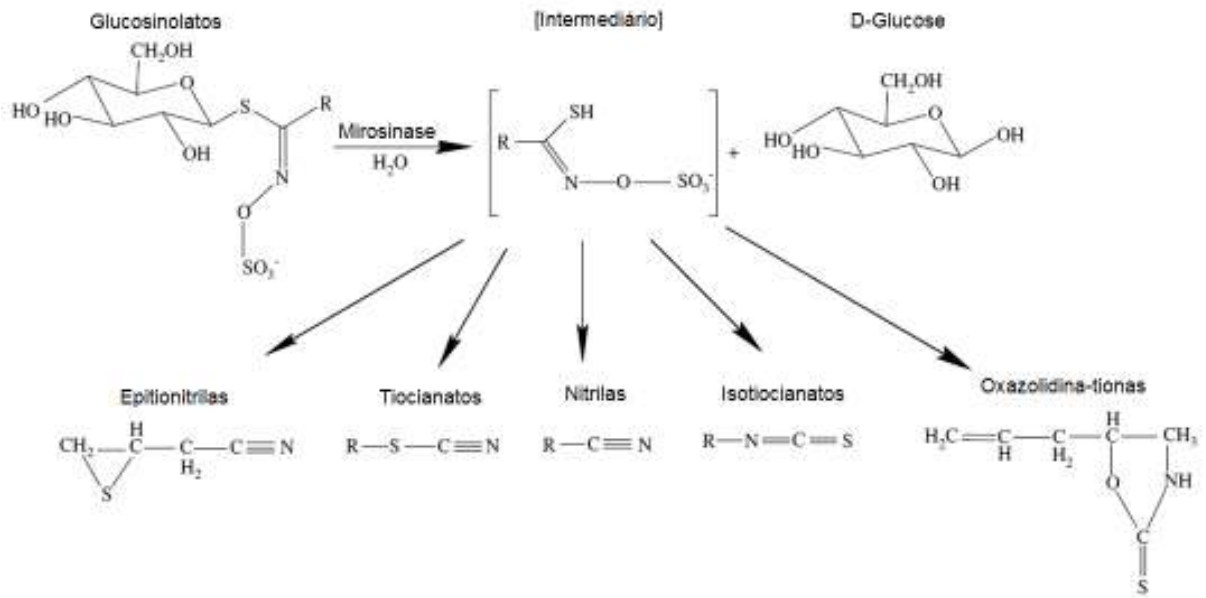


Figura 1 - Glucosinolatos e seus produtos de hidrólise

Fonte: VIG et al. (2009)

Os glucosinolatos têm uma ocorrência restrita em um número relativamente pequeno de famílias vegetais, podendo ser encontrados nas sementes, raízes, caules e folhas destas plantas. Estão presentes, em geral, em vegetais da família *Brassicaceae* (mostarda, brócolis, couve, nabo, rabanete, repolho, couve-flor, agrião) e

especificamente em *Carica papaya* (mamão) (NIELSEN; RIOS, 2000; FAHEY; ZALCMANN; TALALAY, 2001; NAKAMURA et al., 2007).

Dos derivados dos glucosinolatos, os isotiocianatos são conhecidos como os mais reativos biologicamente, e se destacam por apresentarem um largo espectro de atividade contra microrganismos patogênicos (bactérias e fungos), nematóides, insetos e ervas daninhas. Atualmente este grupo de compostos tem despertado um grande interesse no mundo científico devido ao seu potencial anticarcinogênico. Dentre os isotiocianatos com reconhecida atividade antimicrobiana destacam-se o benzil-isotiocianato, o feniletil isotiocianato e o alil isotiocianato (BLAŽEVIĆ et al., 2010; DELAQUIS; SHOLBERG, 1997; LUCIANO et al., 2008; SHIN; MASUDA; NAOHIDE, 2004).

2.1.5 Compostos Fenólicos

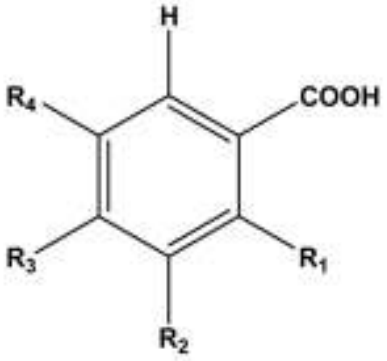
Os compostos fenólicos são substâncias naturalmente presentes na maioria dos vegetais (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006). Quimicamente podem ser definidos como substâncias que possuem um anel aromático contendo um ou mais grupos hidroxila e são derivados principalmente do metabolismo do ácido chiquímico e/ou da via do acetato. Alguns deles podem estar armazenados nas células (pré-formados) e outros podem ser sintetizados especificamente em resposta ao ataque de um agente patogênico (fitoalexinas) (BRAGA, 2008). São bem conhecidos como substâncias fungitóxicas, antibacterianas e antiviróticas em plantas. O efeito inibitório varia entre os diferentes compostos deste grupo (AYAZ et al., 2008; BAYDAR; ÖZKAN; SAĞDIÇ, 2004; WEN et al., 2003; RODRÍGUEZ VAQUERO; ALBERTO; NADRA, 2007a).

O mecanismo de ação dos compostos fenólicos ainda não está completamente elucidado, porém supõe-se que sua ação pode estar relacionada à alteração da permeabilidade da membrana bacteriana causando perda de constituintes celulares; interação com enzimas microbianas afetando a atividade enzimática ou ainda provocando desnaturação de proteínas; ou destruição ou inativação funcional do material genético (LÓPEZ-MALO VIGIL; PALOU; ALZAMORA, 2005; KIM et al., 1995). Destacam-se, pela sua atividade farmacológica, os ácidos fenólicos, os flavonóides e os taninos.

2.1.5.1 Ácidos fenólicos

Nas plantas é relativamente pequeno o numero de fenóis livres. Os ácidos fenólicos se dividem em dois grupos: os ácidos hidroxibenzóicos e os ácidos hidroxicinâmicos (STALIKAS, 2007).

Os ácidos hidroxibenzóicos apresentam uma estrutura C_6-C_1 (Figura 2). Dentre os que compõem esse grupo estão o ácido *p*-hidroxibenzóico, o ácido *o*-hidroxibenzóico (ácido salicílico), o ácido gálico e o seu dímero, o ácido elágico (os dois últimos representados nos taninos hidrolisáveis) (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997; STALIKAS, 2007).

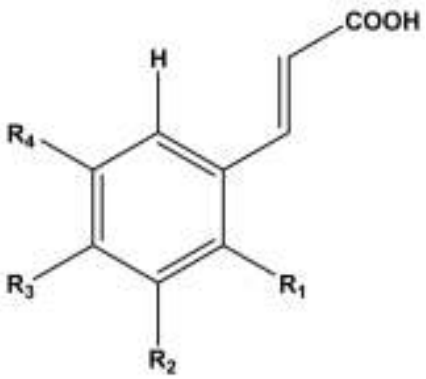


Nome	R1	R2	R3	R4
Ácido Benzóico	H	H	H	H
Ácido ρ-Hidroxibenzóico	H	H	OH	H
Ácido Vanílico	H	OCH_3	OH	H
Ácido Gálico	H	OH	OH	OH
Ácido Protocatéquico	H	OH	OH	H
Ácido Siríngico	H	OCH_3	OH	OCH_3
Ácido Gentísico	OH	H	H	OH
Ácido Verátrico	H	OCH_3	OCH_3	H
Ácido Salicílico	OH	H	H	H

Figura 2 - Estruturas de ácidos hidroxibenzóicos

Fonte: STALIKAS (2007)

Os ácidos hidroxicinâmicos apresentam uma estrutura C_6-C_3 (Figura 3). Dentre eles os mais difundidos na natureza são o ácido *p*-cumárico, o ácido caféico, o ácido ferúlico e o ácido sináptico (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006). Podem ser encontrados na forma livre e em grande número de diferentes formas esterificadas. O ácido clorogênico (éster do ácido quínico) e o ácido rosmarínico (presente no alecrim) são exemplos de formas esterificadas (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997; CUNHA; ROQUE, 2009).



Nome	R1	R2	R3	R4
Ácido Cinâmico	H	H	H	H
Ácido *o*-Cumárico	OH	H	H	H
Ácido *m*-Cumárico	H	OH	H	H
Ácido *p*-Cumárico	H	H	OH	H
Ácido Ferúlico	H	OCH_3	OH	H
Ácido Sinápico	H	OCH_3	OH	OCH_3
Ácido Caféico	H	OH	OH	H

Figura 3 - Estruturas de ácidos hidroxicinâmicos
Fonte: STALIKAS (2007).

Os ácidos fenólicos quando sob a forma de ésteres ou de heterosídeos são solúveis em água e em solventes orgânicos polares (metanol, etanol), enquanto que sob a forma de ácido são solúveis nos solventes orgânicos em meio ácido (CUNHA; ROQUE, 2009).

Apresentam propriedade antioxidante e acredita-se que sua capacidade de sequestrar radicais livres ocorra através da capacidade de doação de um átomo de hidrogênio, que pode variar em função do composto doador (ROBBINS, 2003).

2.1.5.2 Flavonóides

Os flavonóides estão entre os compostos naturais mais disseminados em plantas, registrando mais de 8.000 deles, tanto em estado livre quanto como em glicosídeos. Sua estrutura química baseia-se num esqueleto de carbono C_6-C_3-C_6, dispostos em três anéis, rotulados como A, B e C (Figura 4). As principais categorias estruturais gerais dos flavonóides são as flavonas, as flavanonas, os flavonóis, as antocianidinas e as isoflavonas (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006; STALIKAS, 2007).

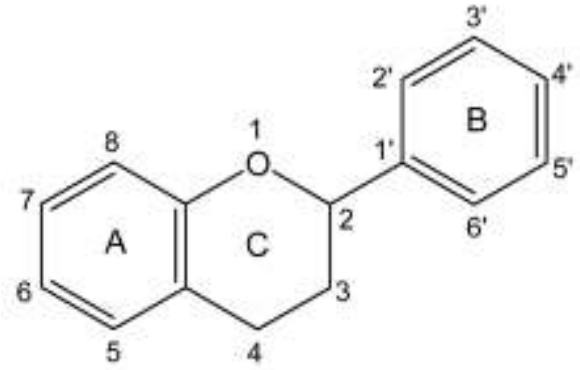


Figura 4 - Estrutura básica dos Flavonóides
Fonte: STALIKAS (2007).

Os flavonóides estão presentes, em geral, em folhas, flores e frutos, porém podem também ser encontrados em sementes, nozes, grãos, especiarias e em diversas plantas medicinais. Estão presentes também em vinhos e chás (PIETTA, 2000).

Estão relacionados a diversas funções de significado biológico nas plantas. Podem atuar na proteção das células vegetais contra estresse através do sequestro de radicais livres, estão associados à defesa contra insetos indesejáveis e atuam também como sinais para agentes polinizadores, devido à sua influência na coloração das plantas (WANG; CAO; PRIOR, 1997). Diversos estudos associam ainda, o papel

preventivo do consumo de frutas e hortaliças na proteção contra o câncer e doenças cardíacas e a participação dos flavonóides nessa prevenção (DIXON; PASINETTI, 2010; GHOSH; SCHEEPENS, 2009).

Uma das funções dos flavonóides (assim como dos polifenóis) está relacionada à proteção das plantas contra a invasão microbiana. Sendo assim, há um crescente interesse na sua atuação no combate a microrganismos patogênicos ao homem, e sua aplicação cogitada como conservante em alimentos e até mesmo no combate às doenças de origem microbiana em seres humanos (HARBORNE; WILLIAMS, 2000).

2.1.5.3 Taninos

Os taninos são substâncias complexas muito disseminadas no reino vegetal. Ocorrem em geral como uma mistura de polifenóis, são hidrossolúveis, de caráter adstringente e apresentam como característica marcante a precipitação de proteínas. De acordo com suas características estruturais, podem ser classificados como taninos hidrolisáveis e taninos condensados (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997; BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

Os taninos hidrolisáveis são formados a partir da esterificação do ácido gálico ou do ácido hexaidroxidifênico e/ou seus derivados com um açúcar (geralmente a glicose). Apresentam esse nome, pois são facilmente hidrolisados, produzindo os respectivos ácidos fenólicos e o açúcar correspondente. O ácido hexaidroxidifênico, após hidrólise, rapidamente se lactoniza formando o ácido elágico (BATISTA, 2009).

Os taninos condensados são polímeros formados por moléculas de leucoantocianidinas (3,4-flavanodióis) e/ou de catequinas (3-flavanóis). A reatividade dessas moléculas promove a reação de condensação e a formação do polímero. Os taninos condensados também são conhecidos como proantocianidinas, uma vez que, após o tratamento com ácido quente, dão origem às antocianidinas (DIXON; XIE; SHARMA, 2005).

Os taninos podem ser encontrados em folhas, frutos, cascas e madeira de plantas que produzem esses metabólitos. Suas concentrações podem variar em função dos órgãos da planta, idade, espécie e estado de desenvolvimento (predominando em frutos

verdes). Em uma mesma planta podem ser encontrados tanto os taninos hidrolisáveis quanto os condensados (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

O papel biológico de muitos taninos, nas plantas, está relacionado com a proteção contra insetos, bactérias e fungos, e assim como outros compostos fenólicos, demonstram propriedades antioxidantes, antimutagênica e anticarcinogênicas (GÜLÇIN et al., 2010; SCALBERT, 1991; WU et al., 2004).

Como medicamento, os taninos são usados no tratamento de diarréias, problemas estomacais, como antiinflamatórios, antissépticos e hemostáticos. Apresentam também a propriedade de precipitar alcalóides (exceto a morfina) e metais pesados, podendo ser empregados como um antídoto nos envenenamentos com esses compostos (BATISTA, 2009).

A atividade antimicrobiana dos taninos está baseada em três hipóteses: ação dos taninos sobre a membrana celular de bactérias e fungos, provocando alteração do metabolismo microbiano; inibição de enzimas microbianas e/ou complexação com os substratos dessas enzimas; complexação com íons essenciais ao metabolismo das bactérias e fungos (AKIYAMA et al., 2001; SCALBERT, 1991).

2.1.6 Atividade antibacteriana de compostos de origem vegetal

Diversos trabalhos têm sido realizados para avaliar a atividade antimicrobiana de compostos de origem vegetal sobre uma vasta gama de bactérias.

Al-Habib et al. (2010) demonstraram a atividade antibacteriana de extratos de sementes e bagaços de uva contra *Staphylococcus aureus*, resistentes à meticilina. O extrato bruto de sementes de uva apresentou inibição de todas as cepas testadas na concentração de 3 mg/ml. A atividade antibacteriana foi bactericida, demonstrando um rompimento da parede celular das bactérias através das análises de microscopia eletrônica de transmissão e varredura.

Rodríguez Vaquero et al. (2007b) avaliaram as propriedades antimicrobianas de flavonóides puros (rutina, catequina e quercetina), ácidos fenólicos (gálico, vanílico, protocatecuico e caféico) e polifenóis totais de três variedades de vinhos argentinos (Cabernet Sauvignon, Malbec e Merlot) contra *Listeria monocytogenes* e constataram que

o ácido caféico e os flavonóides rutina e quercetina foram os compostos com maior atividade inibitória sobre *L. monocytogenes*.

Gañan et al. (2009) estudaram o potencial antimicrobiano do vinho e alguns de seus compostos sobre *Campylobacter jejuni*. Eles verificaram que o poder microbicida do vinho tinto foi maior do que o vinho branco, e ainda que os ácidos gálico e *p*-hidroxibenzóico reduziram a viabilidade de *C. jejuni* em concentrações de apenas 1 mg/L. Outros compostos fenólicos como o galato de metila, a epicatequina, o ácido sináptico, o ácido vanílico e o ácido caféico foram microbicidas em concentrações a partir de 10 mg/L. O ácido ferúlico e o ácido cumárico foram eficazes a partir de 100 mg/L. A quercetina e a catequina não apresentam ação antimicrobiana sobre a bactéria na concentração de 1000 mg/L.

Rodríguez Vaquero et al. (2007a) investigaram as propriedades antimicrobianas de compostos fenólicos puros e polifenóis de diferentes vinhos contra diversos patógenos. Foi observado que as espécies bacterianas apresentaram sensibilidades diferentes para as diferentes concentrações de compostos fenólicos. *Escherichia coli* foi a bactéria mais sensível e *Flavobacterium sp*. foi resistente contra todos os compostos fenólicos testados. Todas as amostras de vinho mostraram propriedades antimicrobianas e a inibição aumentou em função do aumento da concentração de polifenóis dos vinhos.

Luciano e Holley (2009) verificaram a atividade antimicrobiana de alil isotiocianato sobre *Escherichia coli* O157:H7. Este composto apresentou maior atividade antimicrobiana em baixos valores de pH, demonstrando, em pH 4,5 e 5,5 um valor de CIM de de 25 µL/L, enquanto que em pH 8,5 este valor subiu para 500 µL/L.

Turgis et al. (2009) investigaram como o óleo essencial de mostarda (que apresenta como componente principal o alil isotiocianato) afetou a membrana celular de *Escherichia coli* O157: H7 e *Salmonella typhi*. Eles verificaram que o tratamento com o óleo essencial afetou a integridade da membrana das bactérias e induziu a uma diminuição da concentração de ATP intracelular.

2.1.7 *Listeria monocytogenes*

A *Listeria monocytogenes* é uma bactéria anaeróbia facultativa, não esporulada, gram-positiva, capaz de crescer rapidamente em ágar sangue, produzindo hemólise incompleta. Possui ótimo crescimento a temperaturas de 30° a 37°C, mas ao contrário de outras bactérias também cresce sob temperatura de refrigeração (4° a 10°C) e pelo enriquecimento frio pode ser separada de outras bactérias contaminantes, pela longa incubação nessa faixa de temperatura (LORBER, 2007).

Das seis espécies de *Listeria* (*L. monocytogenes, L. seeligeri, L. welshimeri, L. innocua, L. ivanovii, e L. grayi)*, apenas a *L. monocytogenes* é patogênica para seres humanos. Existem pelo menos 13 sorotipos de *L. monocytogenes*, mas quase todas as doenças são devido aos tipos 4b, 1/2a e 1/2b, limitando a utilidade de sorotipagem para investigações epidemiológicas (BUCHOLZ; MASCOLA, 2001).

É generalizada na natureza, sendo comumente encontrada no solo, vegetação em decomposição, esgotos, água e como parte da flora fecal de muitos animais. As maiores taxas de infecção são constatadas em lactentes com menos de um mês de vida e em adultos acima dos 60 anos de idade. Gestantes representam cerca de 30% de todos os casos de listeriose (JAY, 2005; LORBER, 2007).

A *Listeria monocytogenes* é o agente etiológico da listeriose, uma severa infecção alimentar. A infecção na maioria das vezes começa com a ingestão de alimentos contaminados com o microrganismo. A fase oral do inóculo necessária para produzir infecção clínica é desconhecida. O período de incubação na infecção invasiva não está bem estabelecido, mas existem provas de alguns casos específicos, relacionados com a ingestão do alimento contaminado, que apontam para um período médio de incubação de 31 dias, com um intervalo de 11 a 70 dias (LORBER, 2007; SCHUCHAT; SWAMINATHAN; BROOME, 1991).

No início da infecção, a listeriose pode se assemelhar a qualquer estado febril, comum nas viroses e bacterioses. Quando atinge o sistema nervoso central, podem ocorrer dores de cabeça, confusão mental, perda do equilíbrio e convulsões. Na sua forma mais grave pode causar meningite purulenta, falência múltipla de órgãos e abortos durante os primeiros seis meses de gravidez. A bactéria atinge principalmente

pessoas com o sistema imunológico comprometido ou ainda em desenvolvimento, como recém-nascidos, idosos, pessoas com câncer, diabetes ou doenças crônico-degenerativas, portadores do vírus da AIDS e principalmente gestantes (BUCHOLZ; MASCOLA, 2001; SMITH et al., 2003).

A *Listeria monocytogenes* é um parasita facultativo intracelular que pode invadir e se replicar dentro de macrófagos e em outras células não fagocitárias, como células epiteliais e hepatócitos. Quando contraída por via oral, coloniza o trato intestinal, e a partir deste, invade o tecido, e entra na corrente sanguínea, por onde alcança outras células susceptíveis do corpo. Uma vez na corrente sanguínea a disseminação hematogênica pode ocorrer em qualquer local (CRUZ; MARTINEZ; DESTRO, 2008; SCHUCHAT; SWAMINATHAN; BROOME, 1991).

No Brasil, durante três décadas, o Instituto Oswaldo Cruz (IOC) analisou a ocorrência de *Listeria monocytogenes*, em várias fontes de infecção e vias de transmissão provenientes de diversas regiões do país. Essa bactéria tem sido reconhecida como um patógeno de origem alimentar e se tornou uma grande preocupação para a indústria de alimenros e autoridades sanitárias. A listeriose tornou-se uma preocupação no Brasil e no mundo a partir da década de 80, quando ocorreram surtos, sobretudo na América do Norte, onde a partir daí a saúde pública passou a dedicar uma atenção especial sobre a prevalência da bactéria nos vários veículos de transmissão, em particular os alimentos. O trabalho realizado pelo IOC confirmou a presença dos mesmos tipos sorológicos já identificados em outras partes do mundo e a predominância do quadro de meningite nas formas mais graves (FONTOURA, 2006).

Em diversos países foram documentados vários casos que resultaram em infecção invasiva (bacteremia, meningite), tendo como veículos leite (FLEMING et al., 1985), queijos moles (MACDONALD et al., 2005), manteiga (LYYTIKAINEN et al., 2000), truta defumada (MIETTINEN et al. 1999), produtos feitos de carne de porco prontos para o consumo (GOULET et al., 1998), dentre outros. Os surtos diminuíram graças às precauções higiênicas e sanitárias instituídas nas indústrias alimentícias com o objetivo de prevenir a contaminação nos processos de produção e armazenamento.

2.1.8 Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro*

Há uma variedade de métodos laboratoriais que podem ser empregados para medir a susceptibilidade *in vitro* das bactérias aos agentes antimicrobianos. Alguns são considerados qualitativos, como os métodos de difusão e outros quantitativos, como os métodos de diluição. A aplicação destes testes pode ser realizada não só para avaliar a sensibilidade ou resistência de um microrganismo a uma determinada droga, como também para a investigação de novos agentes antimicrobianos. Estes testes são frequentemente utilizados para a verificação do efeito bactericida ou bacteriostático, bem como para a demonstração das drogas que exibem esses efeitos (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS - NCCLS, 2003; TAVARES, 2009).

2.1.8.1 Teste de difusão

Este teste trata-se de uma prova rápida de susceptibilidade a antimicrobianos, essencialmente qualitativa. O método de difusão é geralmente realizado em meio de cultura sólido e podem ser utilizadas diferentes técnicas para a adição do composto ou extrato a ser testado. As técnicas de aplicação da substância antimicrobiana no método de difusão são por meio de discos de papel, cilindros de porcelana, ou de aço inoxidável, ou mesmo orifícios feitos no próprio meio de cultura (OSTROSKY et al., 2008; TAVARES, 2009).

Este teste consiste na difusão da solução antimicrobiana no meio de cultura, estando este inoculado com o microrganismo. O resultado é obtido após 18-24 horas de incubação através da determinação do tamanho da zona clara de inibição ao redor do disco ou orifício. O diâmetro da zona de inibição irá depender da atividade da solução antimicrobiana sobre a cepa do teste. A realização deste teste com antibióticos já apresenta valores padronizados para tamanhos das zonas de inibição para cada espécie bacteriana e o respectivo antibiótico, permitindo, portanto classificar o microrganismo isolado em resistente, intermediário ou sensível (TAVARES, 2009; GOODMAN; GILMAN, 2010).

Neste teste, a avaliação da atividade antimicrobiana pode ser significativamente influenciada por fatores relacionados ao material a ser utilizado e à execução do método como o tipo e tamanho do disco ou orifício e a espessura e uniformidade do ágar na placa (quando se tratar do teste de difusão com orifício). O controle rigoroso destes parâmetros é fundamental para evitar variações e para uma boa resolução dos resultados (OSTROSKY et al., 2008).

2.1.8.2 Concentração inibitória mínima

Os métodos de diluição em caldo ou ágar são igualmente aceitáveis e medem quantitativamente a atividade *in vitro* de um agente antimicrobiano contra um determinado isolado bacteriano (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS - NCCLS, 2003).

Os testes de diluição empregam os compostos antimicrobianos em concentrações de diluições seriadas em meio de cultura sólido ou líquido contendo a cultura do microrganismo a ser testado. A menor concentração do agente capaz de impedir um crescimento visível depois de 18-24 horas de incubação é conhecida como *concentração inibitória mínima* (CIM) (GOODMAN; GILMAN, 2010; NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS - NCCLS, 2003), e corresponde à concentração bacteriostática (TAVARES, 2009). Por esse método pode-se determinar, também a *concentração bactericida mínima* (CBM) do agente antimicrobiano. Para isso, transfere-se uma pequena alíquota dos tubos onde não houve crescimento visível do microrganismo para placas contendo meio de cultura sólido, e verifica-se qual a menor concentração onde não houve crescimento (TAVARES, 2009).

Este método pode ser realizado utilizando-se tubos de ensaio, com volume de meio de cultura variando entre 1 e 10 mL (macrodiluição) ou pode também ser realizado utilizando-se microplacas com 96 poços, com volume de meio de cultura entre 0,1 e 0,2 mL (microdiluição). O parâmetro utilizado para avaliar o crescimento microbiano pode ser através da turbidez do meio, ou no caso da microdiluição, através de um agente revelador como a resazurina (um indicador de óxido-redução) (OSTROSKY et al., 2008; PALOMINO et al., 2002).

O método da microdiluição, além da sua sensibilidade e quantidade mínima de reagentes utilizados, apresenta também a vantagem da realização de um maior número de repetições, acrescendo uma maior confiabilidade nos resultados obtidos (OSTROSKY et al., 2008).

2.1.9 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma tecnologia capaz de medir e analisar simultaneamente várias propriedades de uma única célula ou partícula em suspensão. Dentre as propriedades medidas, informações importantes são avaliadas, como a dimensão celular, a granulosidade/complexidade interna da célula, a morfologia e os compostos intracelulares com fluorescência intrínseca ou passíveis de se ligarem a corantes fluorescentes (fluorocromos) (GIVAN, 2001).

O citômetro de fluxo é um aparelho constituído por cinco componentes principais: fonte de radiação, lâmpada de mercúrio ou laser, uma câmara de fluxo, unidades de filtros ópticos para seleção de um intervalo de comprimento de onda específico, fotodiodos ou fotomultiplicadores para a detecção sensível dos sinais e uma unidade que processa os dados recolhidos (Figura 5) (ÁLVAREZ-BARRIENTOS et al., 2000; SILVA et al., 2004).

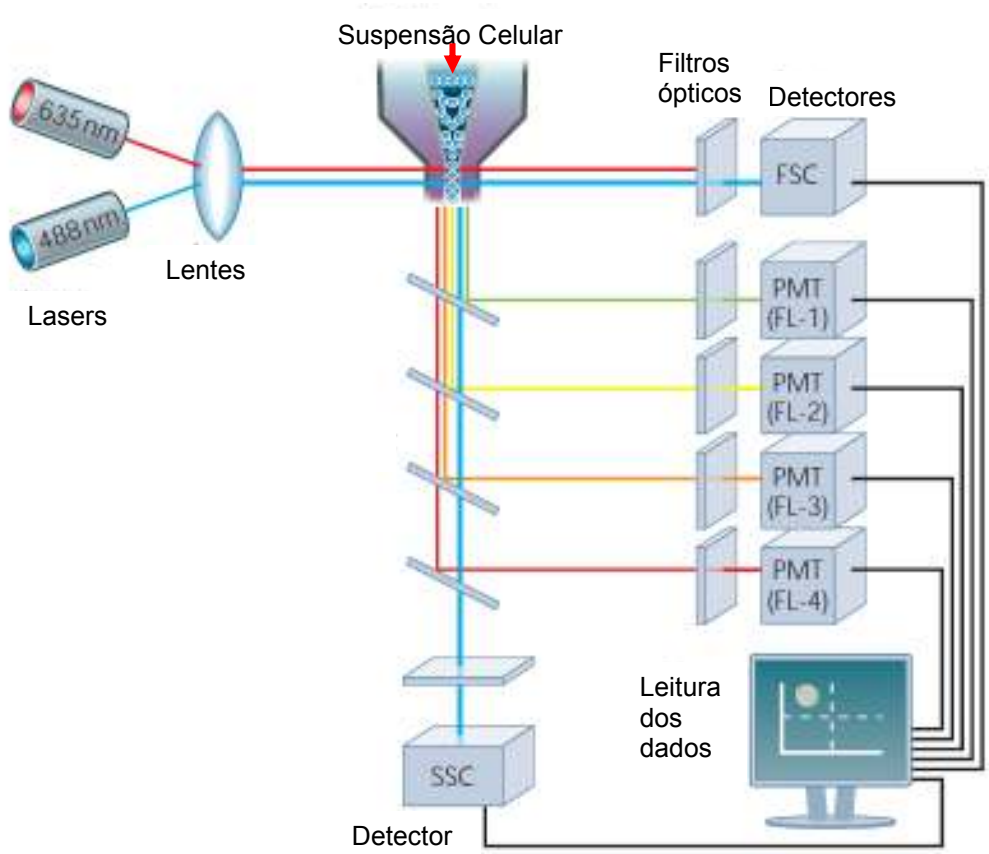


Figura 5 - Esquema do funcionamento de um citômetro de fluxo
Fonte: RAHMAN et al. (2011).

Quando uma suspensão celular é injetada no citômetro, as células atravessam a câmara de fluxo e um fluido externo, sob regime laminar, focaliza dinamicamente o fluido da amostra numa região estreita e a passagem acontece célula a célula através do feixe de radiação, perpendicular ao fluxo. O feixe de radiação ao interceptar a célula na câmara, pode sofrer uma dispersão na direção frontal ou lateral, ou ainda, emitir fluorescência se a célula estiver marcada com um fluorocromo (ÁLVAREZ-BARRIENTOS et al., 2000; SILVA et al., 2004).

A radiação dispersa na direção frontal (Forward Scatter Channel - FSC) é detectada diretamente por fotodiodos que coletam informações referentes ao tamanho da célula, podendo também fazer a distinção entre restos celulares e células vivas (RAHMAN et al., 2006).

A radiação dispersa lateralmente (Side Scatter Channel - SSC) é desviada a 90^0 por lentes, espelhos dicróicos e filtros ópticos. É focada por fotomultiplicadores e fornece informações referentes à complexidade da célula, como características da parede celular e número de organelas presentes. O FSC e o SSC são únicos para cada célula, e uma combinação destes dois parâmetros pode ser usada para diferenciar tipos de células presentes em uma amostra heterogênea (RAHMAN et al., 2006; SILVA et al., 2004).

As medidas de fluorescência em diferentes comprimentos de onda podem fornecer dados quantitativos e qualitativos sobre as células marcadas com um fluorocromo. Os citômetros de fluxo apresentam canais de fluorescência (FL) para detectar a luz emitida em diferentes faixas de comprimento de onda (GIVAN, 2001).

A luz dispersa, bem como a fluorescência produzida, são captadas e convertidas em sinais elétricos. O resultado é uma informação quantitativa sobre cada célula analisada. Como uma grande quantidade de células é analisada em um tempo muito curto pode-se obter rapidamente uma informação estatisticamente válida sobre uma população de células (SILVA et al., 2004).

A informação que se pode obter dos ensaios de viabilidade sobre os estados fisiológicos das células é limitada a dois níveis extremos de atividade metabólica: o saudável, presente em células viáveis com capacidade para se dividirem, e o correspondente à morte celular. Contudo, a sensibilidade dos microrganismos ao ambiente em que se desenvolvem contesta a informação obtida através dos ensaios de viabilidade, pois células que se encontrem num estado fisiológico intermediário entre o metabolicamente ativo e de morte celular podem não ser contabilizadas (PAPARELLA et al., 2008).

A vantagem da citometria de fluxo em analisar células individualmente, consiste na detecção de uma variedade de estados fisiológicos intermediários que realmente existem numa determinada população. (PAPARELLA et al., 2008; SILVA et al., 2004). Assim a combinação de diferentes fluorocromos como o Diacetato de Carboxifluoresceína (cFDA) e o Iodeto de Propídeo (PI) permite identificar grupos de células viáveis, que não se encontram metabolicamente ativas, e que também não estão mortas (células viáveis, mas não cultiváveis). O cFDA, é usado principalmente para a avaliação da atividade enzimática da célula. É um precursor, não lipofílico fluorescente que facilmente se difunde através

das membranas celulares. O grupo diacetato sofre hidrólise dentro do compartimento intracelular, por esterases inespecíficas da célula, ficando aderido à célula a carboxifluoresceína (cF) que é um o composto fluorescente. Em contraste, o Iodeto de Propídeo (PI) é um corante impermeável à membrana celular, e se liga a RNA e DNA em células com membrana danificada (Figura 6) (HOEFEL et al., 2003). Diversos trabalhos utilizam a combinação desses dois fluorocromos para caracterizar diferentes estágios fisiológicos de microorganismos. Ananta et al. (2004) estudou o efeito de diferentes condições de estresse sobre a viabilidade em *Lactobacillus rhamnosus.* Paparella et al. (2008) avaliou as respostas fisiológicas de *Listeria monocytogenes* após a exposição à diferenetes óleos essenciais como: tomilho, canela e orégano aplicados isoladamente e em combinação com NaCl.

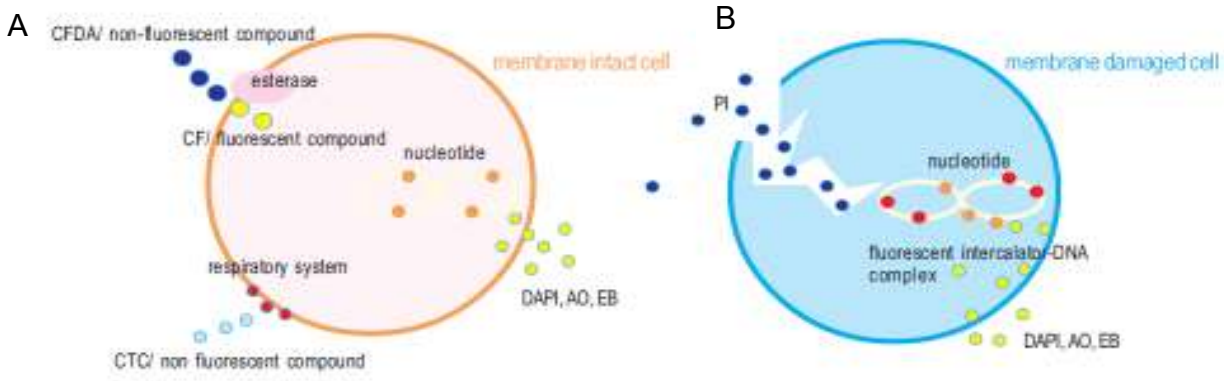


Figura 6 - Representação esquemática da ligação dos fluorocromos cFDA (A) em uma célula viável e PI (B) em uma célula danificada
Fonte: DOJINDO (2011).

Desse modo pretende-se nessa pesquisa identificar resíduos agroindustriais com atividade contra *Listeria monocytogenes*, bem como identificar a composição química, visando aplicação na indústria de alimentos.

2.2 Materiais e métodos

2.2.1 Obtenção dos resíduos agroindustriais

Os resíduos agroindustriais foram adquiridos a partir de diferentes localidades. Os resíduos vinícolas foram derivados do processamento de uvas tintas e brancas fornecidos pela Embrapa Uva e Vinho - RS e Embrapa Semi-Árido - PE. Os resíduos de goiaba e tomate foram fornecidos pela Cêpera - Agroindustrial, localizada em Ibitirama-SP. O resíduo de alcachofra foi proveniente da Agroindústria Conservas de Alcachofras Bom Sucesso em São Roque-SP. A película de amendoim foi fornecida pela CAP Agroindustrial, localizada em Dumont-SP. Os resíduos de talo de beterraba, talo de brócolis, folha/talo de cenoura, casca de abóbora moranga, folhas/talo de nabo, casca de maracujá e folha/talo de rabanete foram adquiridos de hortas e feiras da região de Piracicaba – SP. Os demais resíduos foram fornecidos pelo Restaurante Universitário da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”– USP, Piracicaba-SP. A tabela 3 apresenta a relação dos resíduos e a parte utilizada na extração dos compostos.

Tabela 3 - Resíduos agroindustriais utilizados na determinação da atividade antibacteriana

	Resíduos	Parte utilizada
R01	Abóbora moranga *(Cucurbita maxima* Duch.)	Cascas
R02	Abobrinha verde (*Cucurbita pepo* L.)	Cascas
R03	Alcachofra (*Cynara scolymus* L.)	Pétalas das flores
R04	Alface (*Lactuca sativa* L.)	Folhas
R05	Amendoim (*Arachis hypogaea* L.)	Películas
R06	Banana (*Musa* sp.)	Cascas
R07	Beterraba (*Beta vulgaris* L.)	Talos (parte aérea)
R08	Brócolis (*Brassica oleracea* L. var. *italica)*	Talos
R09	Cebola (*Allium cepa* L.)	Cascas
R10	Cenoura (*Daucus carota* L.)	Folhas/talos
R11	Goiaba (*Psidium guajava*)	Bagaço (pele e sementes)
R12	Laranja (*Citrus sinensis*)	Cascas
R13	Mamão (*Carica papaya* L.)	Cascas
R14	Mamão (*Carica papaya* L.)	Sementes
R15	Nabo (*Brassica rapa* var. *rapa)*	Folhas/talos
R16	Maracujá (*Passiflora sp.*)	Cascas
R17	Rabanete (*Raphanus sativus* L.)	Folhas/talos
R18	Tomate (*Lycopersicon esculentum)*	Bagaços (peles e sementes)
R19	Uva Cabernet (*Vitis vinifera* L.)	Engaços e sementes
R20	Uva Isabel (*Vitis labrusca*)	Bagaços
R21	Uva Petit Verdot (*Vitis vinifera* L.)	Bagaços
R22	Uva Syrah (*Vitis vinifera* L.)	Engaços e sementes
R23	Uva Verdejo (*Vitis vinifera* L.)	Engaços e sementes

Todos os resíduos foram liofilizados, homogeneizados e armazenados à -18ºC.

2.2.2 Preparo dos extratos

Os extratos provenientes dos resíduos foram preparados em escala laboratorial com o emprego de solventes de diferentes polaridades (hexano; clorofórmio; acetato de etila; etanol:água (80:20 v/v) e água), como descrito por Melo (2010).

Os resíduos liofilizados foram triturados e 1g de cada resíduo foi extraído com 10 mL de cada solvente. Alguns resíduos (R01, R02, R04, R05, R06, R07, R08, R11, R12,

R15, R16, R17, R19 e R20), na extração com água, formaram uma solução viscosa e, portanto adicionou-se outros 10 mL do respectivo solvente para a realização da extração.

Durante a extração, os extratos foram submetidos a uma agitação por ultrassom durante 15 minutos, em seguida foram centrifugados com velocidade de 5000 rpm por 15 minutos sendo posteriormente filtrados utilizando-se papel de filtro para a separação do sobrenadante. O sobrenadante foi então concentrado em rotaevaporador e/ou liofilizado, de acordo com o solvente utilizado. A figura 7 apresenta o fluxograma do processo de extração.

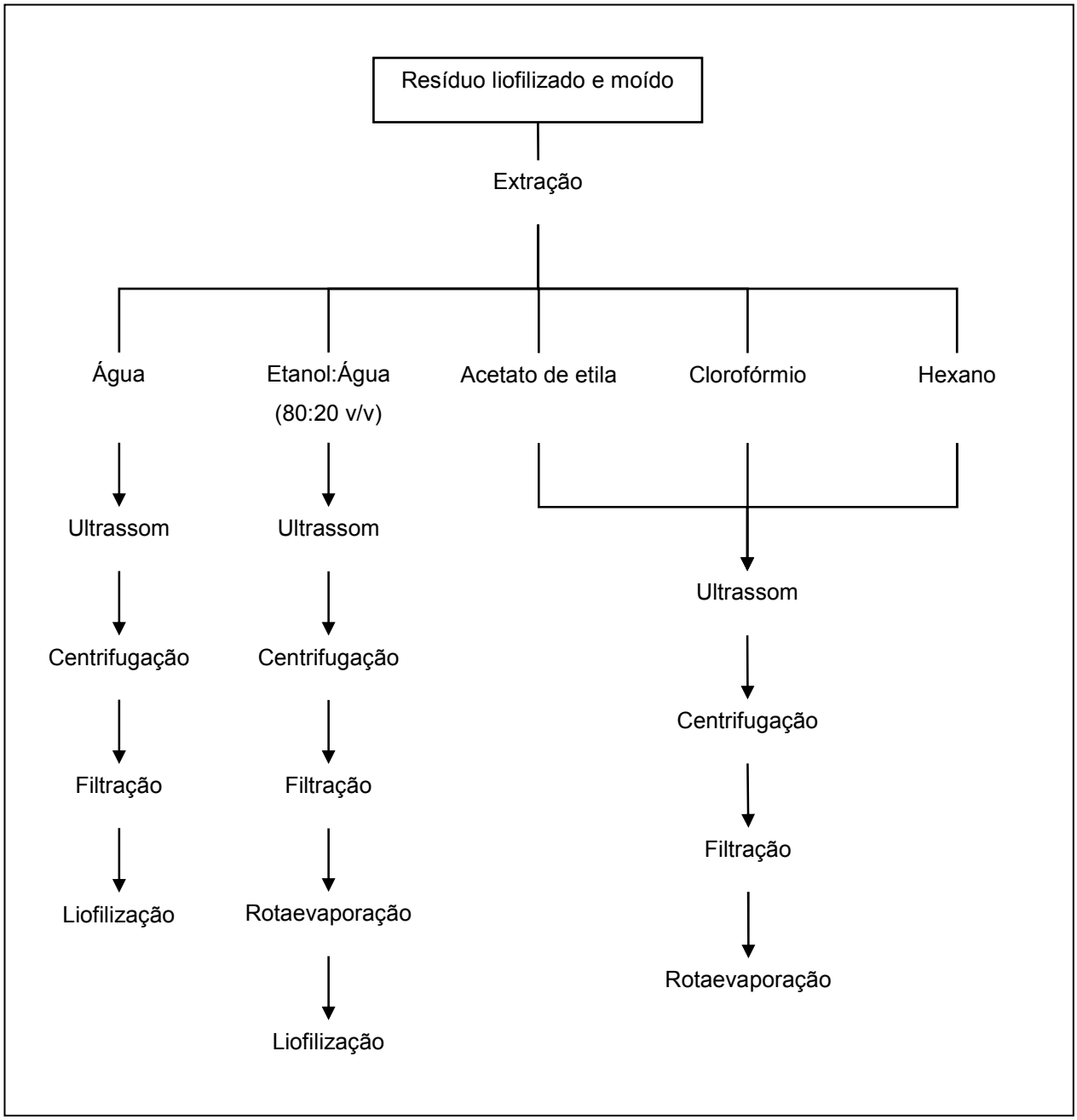


Figura 7 - Fluxograma geral de extração

As massas resultantes de cada extração foram pesadas e redissolvidas em meio de cultura TSB contendo o surfactante TRITON X-100 (éter p-t-octilfenil polioxietileno) a 3%, para a realização do s*creening* da atividade antimicrobiana dos resíduos agroindustriais.

2.2.3 Obtenção da cepa de *Listeria monocytogenes* e preparo do inóculo

A cepa de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, utilizada durante os experimentos, foi obtida da coleção de culturas do Laboratório de Higiene e Laticínios, do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ-USP.

Em tubos inclinados contendo Ágar Triptona Soja (TSA) e 0,6% de Extrato de Levedura foram preparadas culturas estoques do microrganismo, sendo mantidas sob refrigeração a 4ºC e cobertas com vaselina estéril, até a realização das análises. Para utilização nos experimentos, a cepa foi reativada a partir da cultura estoque, em Caldo Triptona Soja (TSB) acrescido de 0,6% de Extrato de Levedura, por 24 horas a 35ºC sendo posteriormente cultivada em placas contendo TSA. Após o crescimento bacteriano, as colônias individuais foram removidas com auxílio de uma alça microbiológica e suspendidas em uma solução de NaCl 0,89% estéril. A suspensão foi preparada segundo a escala 0,5 de Mac Farland, obtendo-se uma concentração final equivalente a 1-2 x 10^8 UFC/mL.

2.2.4 *Screening* da atividade antimicrobiana dos resíduos agroindustriais

O screening foi realizado como uma avaliação preliminar para seleção dos extratos com potencial antimicrobiano. Com esta finalidade foi realizado o teste de difusão em ágar (formação de halo de inibição frente ao microrganismo testado). Os extratos que apresentaram resultado positivo para este teste seguiram para as análises de Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM), citometria de fluxo e avaliação da composição química por cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas (CG-EM).

Durante o desenvolvimento da análise de citometria de fluxo, constatou-se a interferência do surfactante Triton X-100 nos resultados. Sendo assim, as análises de Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Citometria de fluxo foram realizadas sem a adição deste surfactante, e quando necessário, adicionou-se o surfactante Tween 80 a 0,04% (v/v).

2.2.4.1 Teste de difusão em Ágar

O método foi realizado de acordo com Duarte et al. (2003), com algumas modificações. Uma alíquota de 50 µL de cada suspensão bacteriana foi inoculada em 50 mL de meio de cultura TSB semi-sólido (TSB contendo 7% de ágar) à 45°C, sendo a mistura homogeneizada por meio de um agitador magnético. Após a homogeneização, o meio inoculado foi imediatamente distribuído em placas de Petri.

Após a total solidificação do meio foram feitos poços sobre a superfície do ágar semeado utilizando-se cilindros de aço-inoxidável (8mm de diâmetro externo). Após a retirada dos cilindros, o meio de cultura no interior dos poços foi sugado por meio de uma bomba de vácuo. Foram adicionados no interior de cada poço um volume de 40µL dos extratos. Os extratos foram preparados a uma concentração de 3,2 mg/mL. O surfactante TRITON X-100 diluído em meio de cultura TSB a 3% v/v, foi utilizado como controle negativo e como controle positivo foi utilizado uma solução de clorexidina 0,12% v/v. As placas foram mantidas em repouso por 2 horas em temperatura ambiente para permitir a difusão dos extratos e, após esse procedimento, foram incubadas por 24 horas a 35°C. As zonas de inibição de crescimento bacteriano foram medidas com auxílio de uma régua, sendo comparadas aos seus respectivos controles. O experimento foi realizado em triplicata.

2.2.5 Microtécnica para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos

A técnica foi desenvolvida de acordo com as diretrizes do NCCLS (2003), em microplacas de 96 poços, nos quais foram adicionados 100 µL de caldo TSB previamente inoculado com a bactéria. Em seguida foram adicionados 100 µL do extrato em concentrações que variaram em diluição seriada de razão 2. Foram utilizados 4 controles: C1 – TSB, C2 – TSB + Tween 80, C3 – TSB inoculado + Clorexidina 0,12% (v/v) (controle positivo), C4 –TSB inoculado + Tween 80 (controle negativo). As microplacas foram incubadas a 35ºC por 24 horas. Após a incubação foram adicionados 30 µL do corante Resazurina 0,01% (m/v) com o objetivo de verificar,

por meio de leitura visual, em quais poços houve crescimento bacteriano. Nos poços em que o corante não mudou de cor, ou seja, permaneceu roxo, foi considerado ausência de bactérias viáveis. Qualquer evidência na mudança da coloração foi considerado crescimento bacteriano. Para a determinação da CBM, uma alíquota de 10 µL do meio de cultura dos poços considerados inibitórios foram semeados em placas de Petri contendo TSA e incubados a 35ºC por 24 horas. A CBM foi considerada como a menor concentração na qual não houve crescimento de colônias na superfície do meio de cultura.

2.2.6 Citometria de fluxo

2.2.6.1 Preparo do inóculo

O método foi realizado de acordo com Paparella et al. (2008), com algumas modificações. O microrganismo *L. monocytogenes* foi reativado a partir da cultura estoque em meio TSB por 24 horas a 35ºC. Este caldo foi utilizado para inocular um novo caldo TSB por 24 horas a 35ºC, sendo este último utilizado para o preparo do inóculo.

O inóculo foi preparado transferindo-se uma alíquota do meio TSB para um tubo de vidro. A cultura foi lavada com Tampão Fosfato Salina (PBS) e centrifugada a 8000 rpm a 4ºC por 10 minutos, sendo em seguida, ressuspendida em PBS. A suspensão final foi preparada segundo a escala 0,5 de Mac Farland, obtendo-se uma concentração final equivalente a 1-2 x 10^8 UFC/mL.

2.2.6.2 Preparo dos extratos

Os testes foram realizados partindo-se da concentração inibitória mínima (CIM), obtida para cada um dos extratos (item 2.2.5.). Os resíduos foram pesados e solubilizados com PBS, sendo que os resíduos com característica apolar (provenientes da extração com os solventes acetato de etila, clorofórmio e hexano) foram solubilizados em PBS sob adição de Tween 80 a 0,04% (v/v). Os extratos com

característica polar, o PBS e a solução de clorexidina foram filtrados em membrana de 0,22µm. Os extratos com característica apolar não foram filtrados visando evitar a retenção dos mesmos pela membrana filtrante.

Foram utilizados 4 controles: PBS inoculado (Controle negativo); PBS inoculado + Tween 80 (Controle negativo), PBS inoculado + Clorexidina 0,12% (v/v) (controle positivo) e aquecimento a 70ºC por 30 minutos (controle positivo).

2.2.6.3 Análise das amostras por citometria de fluxo

A análise foi realizada no citômetro FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA). O programa Cellquest foi utilizado para aquisição dos dados, sendo coletados 10.000 eventos por amostra. Foram avaliados o espalhamento de luz frontal (FS) e espalhamento de luz lateral (SS) em escala logarítima, análise da área e da largura sobre a curva de fluorescência a 575nm (FL2) em escala linear. Os dados foram analisados com o programa Summit® versão 4.3.

As amostras de *L. monocytogenes* foram incubadas com diferentes extratos, em diferentes tempos de incubação (1 hora, 3 horas e 5 horas), para a identificação do melhor período para a avaliação da atividade antimicrobiana de cada extrato testado. Através dos gráficos de tamanho (FS) e granulosidade (SS) foi selecionada a região onde se encontrava a *L. monocytogenes,* descartando artefatos e grumos (Figura 8A). Em função das diferenças de FS por SS encontradas para as amostras de *L. monocytogenes* na presença dos extratos em relação ao grupo controle (*L. monocytogenes* em solução salina), delimitou-se diferentes regiões: região R1 (presente em todas as amostras); região R2 e região R3, as duas últimas presentes nas amostras de *L. monocytogenes* tratadas com extrato e ausentes no grupo controle.

Avaliando-se a relação entre a área do sinal (total de fluorescência emitido pela célula durante a passagem pelo laser) e a largura do sinal (o tempo que a célula leva para passar pelo laser), pode-se selecionar uma região onde se encontram as células de interesse excluindo-se assim os grumos que foram adquiridos pelo citômetro (GIVAN, 2001). O evento dentro deste espalhamento obedece a uma relação direta entre área e largura da fluorescência, onde foi traçada uma região para análise. Assim, qualquer

evento fora dessa região (R4 da Figura 8B) não foi analisado, podendo corresponder a células grumadas, representando falsos resultados que poderiam comprometer a qualidade da análise (Figura 8B).

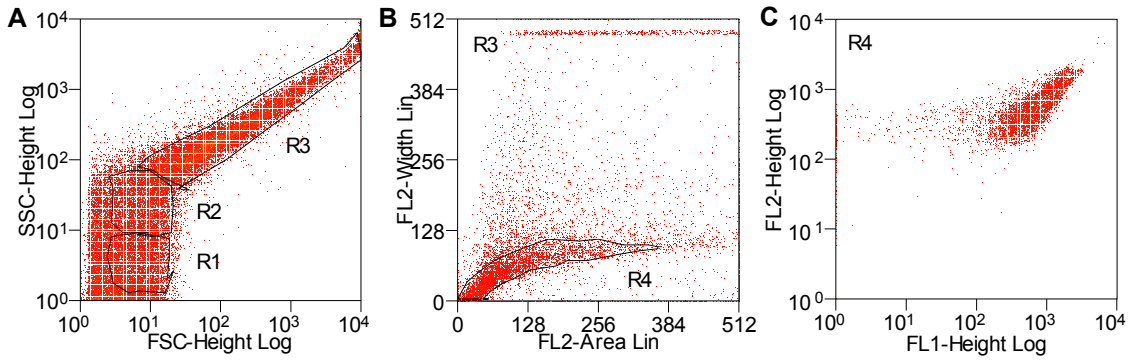


Figura 8 - Representação esquemática da análise de citometria de fluxo após o tratamento com os extratos. Gráfico representando diferenças de FSC (Tamanho) por SSC (Granulosidade) de *Listeria monocytogenes* nas regiões R1, R2 e R3 (A). Gráfico representando área por largura de fluorescência em FL2 da população de *L. monocytogenes* da região R3 (B). Gráfico de fluorescência representando as marcações dos fluorocromos cFDA em FL1 e PI em FL2 da região R4 (C)

Para a avaliação da viabilidade celular, as células foram marcadas com os fluorocromos Diacetato de Carboxifluoresceína (cFDA) detectado no canal FL1 (525 nm ± 20) e Iodeto de propídeo (PI) detectado no canal FL2 (620 nm ± 15) (Figura 8C). A detecção dos fluorocromos cFDA (fluorescência verde) e PI (fluorescência vermelha) foi evidenciada em diferentes intensidades de acordo com a amostra analisada, sendo possível analisar quatro tipos de populações celulares (cF^-PI^+, cF^+PI^+, cF^-PI^- e cF^+PI^-).

A tabela 4 apresenta os possíveis mecanismos celulares relacionados com as diferentes combinações dos fluorocromos (ANANTA; HEINZ; KNORR, 2004).

Tabela 4 - Designação das áreas de células marcadas com cF e PI

Região	Propriedades de fluorescência de células coletadas em cada área	Possível explicação para o estado do mecanismo celular envolvido
R1	cF^- e PI^+	Atividade da esterase não detectada. Membrana comprometida.
R2	cF^+ e PI^+	Esterase ativa. Membrana minimamente danificada
R3	cF^- e PI^-	Não foi detectada a atividade da esterase. Membrana intacta.
R4	cF^+ e PI^-	Esterase ativa. Membrana intacta

Fonte: ANANTA; HEINZ; KNORR (2004).

A atividade residual da enzima esterase foi calculada pela Equação (1), em que a atividade residual da subpopulação foi definida em relação à atividade das células não tratadas com os extratos, contando apenas as células marcadas por cF (Região 4) (ANANTA; HEINZ; KNORR, 2004).

$$AE\ (\%) = \left(\frac{A4\ (Tratada)}{A4\ (Controle)}\right) x\ 100 \qquad (1)$$

Onde:

AE - é a atividade enzimática residual em resposta ao tratamento com os extratos;

A4 (Tratada) - é a porcentagem da população na região 4, após o tratamento com os extratos;

A4 (Controle) - é a porcentagem da população na região 4 antes do tratamento.

2.2.7 Composição química dos extratos

2.2.7.1 Remoção de interferentes das amostras por meio da técnica SPE (Solid Phase Extration)

A SPE é uma técnica empregada em matrizes complexas com o objetivo purificar as amostras, eliminando compostos interferentes.

As massas provenientes dos extratos com caráter polar (obtidas como descrito no item 2.2.2), foram rediluídas com água e acidificadas até pH 2,0, para que fossem aplicadas em cartuchos SPE-LC18 (Supelco, 2 gramas). Antes da aplicação, os cartuchos foram condicionados com metanol e posteriormente com água ácida (pH 2,0).

Alíquotas de 7 mL dos extratos preparados foram aplicadas aos cartuchos. Estes foram lavados com 15 mL de água ácida, e em seguida, os compostos adsorvidos foram eluídos com metanol 100% e a fração foi recolhida em *vial* silanizado. O solvente metanol foi evaporado com corrente de nitrogênio e as amostras foram liofilizadas para na sequência serem derivatizadas.

As massas provenientes dos extratos com caráter apolar (obtidas como descrito no item 2.2.2) não foram submetidas à filtração por SPE, sendo apenas deixadas sob corrente de nitrogênio por alguns minutos, para em seguida, serem derivatizadas.

2.2.7.2 Derivatização – formação de derivados do trimetilsilil (TMS)

Antecipadamente à realização das análises do perfil químico através da técnica de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM), as amostras passaram por uma etapa conhecida por derivatização. Quando a amostra é constituída principalmente por compostos de alta massa molar e/ou grupos funcionais fortemente polares, há a necessidade de realizar a derivatização. A derivatização é utilizada para transformar as substâncias de interesse em derivados com características adequadas à análise por cromatografia gasosa. Entre os reagentes de derivatização para moléculas polares o trimetilsilil é o mais comum (BONATO, 2006). A cromatografia gasosa é útil para analisar gases, substâncias voláteis e termicamente estáveis.

Aos compostos obtidos através da purificação por SPE e aos extratos com caráter apolar foram adicionados 100µL do reagente derivatizante N-metil-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (MSTFA). A mistura foi homogeneizada e levada em estufa à 70ºC durante 10 minutos para reação. Em seguida, o reagente foi evaporado sob fluxo de gás nitrogênio e o produto da derivatização (derivados do trimetilsilil – TMS) foi rediluído em

hexano (600 a 800µL). Após homogeneização, o sobrenadante foi transferido a outro *vial* para injeção no CG-EM.

2.2.7.3 Cromatografia gasosa com espectrometria de massa (CG-EM)

As análises por CG-EM dos extratos foram conduzidas em cromatógrafo gasoso Shimadzu GC 2010 acoplado ao espectrômetro de massas Shimadzu QP2010 *Plus*. As amostras foram separadas em coluna capilar (RTX5MS 30m x 0,25mm x 0,25µm). A programação de temperatura iniciou em 80^{0}C (1 minuto), a taxa de aquecimento de 20^{0}C/minuto alcançou 250^{0}C (1 minuto), passou a 320^{0}C (5 minutos) a taxa de 6^{0}C/minuto, a 310^{0}C (5 minutos) a taxa de 15^{0}C/minuto, a 320^{0}C (10 minutos) a taxa de 20^{0}C/minuto, totalizando 40 minutos de análise. Hélio foi utilizado como gás de arraste. A temperatura do injetor foi de 280^{0}C e o volume de injeção foi de 0,5µL no modo "*splitless*". A interface foi mantida a 280^{0}C e o detector operou no modo "*scanning*" (*m/z* 40-800). A integração foi feita por meio do *software* LabSolutions-GCMS. Os compostos de interesse foram identificados por comparação com os dados obtidos do CG-EM (tempo de retenção e fragmentação iônica) de padrões autênticos silanizados e eluídos nas mesmas condições e com a biblioteca Wiley 8.

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Resultados

2.3.2 Teste de difusão em ágar

O *screening*, para a seleção dos extratos com potencial antimicrobiano, foi realizado por meio do teste de difusão em ágar. A avaliação preliminar da atividade antibacteriana dos resíduos de casca de abóbora moranga, casca de *a*bobrinha verde, pétalas de flores de alcachofra, folha de alface, película de amendoim, casca de banana, talo de beterraba, talo de brócolis, casca de cebola, folhas/talos de cenoura, bagaço de goiaba, casca de laranja, casca e semente de mamão, folhas/talos de nabo,

casca de maracujá, folhas/talos de rabanete, bagaço de tomate e bagaço, semente e pele de uva, para os cinco solventes testados, mostrou que a *L. monocytogenes* foi sensível apenas ao tratamento com os extratos aquosos de talo de brócolis e casca de abóbora moranga e extrato clorofórmico de semente de mamão. Os resultados dos diâmetros dos halos de inibição para os extratos encontram-se dispostos na tabela 5.

Tabela 5 - Diâmetros dos halos de inibição obtidos pelo método de difusão em ágar frente à *Listeria monocytogenes*

Extratos	Halos de inibição (mm)
Extrato aquoso de talo de brócolis	10,0 ± 0,06*
Extrato aquoso de casca de abóbora moranga	10,0 ± 0,06*
Extrato clorofórmico de semente de mamão	9,9 ± 0,10*

* Média de triplicatas ± Desvio Padrão. Controle positivo (halo mm ± desvio padrão): Clorexidina 0,12% (29,9 ± 0,10).

Os extratos apresentaram, em média, halos com tamanhos semelhantes, variando de 10,0 mm para os extratos aquosos de casca de abóbora e talo de brócolis e 9,9 mm para o extrato clorofórmico de semente de mamão.

O surfactante Triton X-100 foi inicialmente utilizado para a solubilização dos extratos provenientes dos solventes hexano, acetato de etila e clorofórmio, insolúveis no meio de cultura utilizado. Porém como forma de padronização da metodologia todos os extratos provenientes dos cinco solventes foram solubilizados em meio TSB contendo 3% de Triton X-100.

O controle negativo (TSB contendo 3% de Triton X-100), aplicado durante o teste de difusão e a análise de CIM, não apresentou resultados de inibição de *L. monocytogenes* ATCC 7644 na concentração testada. Porém, por meio da análise de citometria de fluxo (e posterior realização da CIM sem o uso do surfactante) verificou-se que a utilização deste composto potencializou a ação dos extratos sobre a bactéria. Sendo assim, este tensoativo foi excluído das análises. Segundo Rocha (1999) o Triton X-100 é um agente de solubilização utilizado para permeabilizar células e para extrair e purificar proteínas de membranas. Esta interferência foi verificada apenas após a realização de vários testes e seria impraticável a repetição de todas as análises do teste de difusão sem a utilização do Triton X-100. Portanto, as análises posteriores (CIM,

CBM e citometria de fluxo) foram realizadas sem a utilização deste composto. Quando a utilização de um composto emulsificante fez-se necessária, utilizou-se o tensoativo Tween 80 a 0,04% (v/v), composto comumente utilizado em teste de antibiogramas.

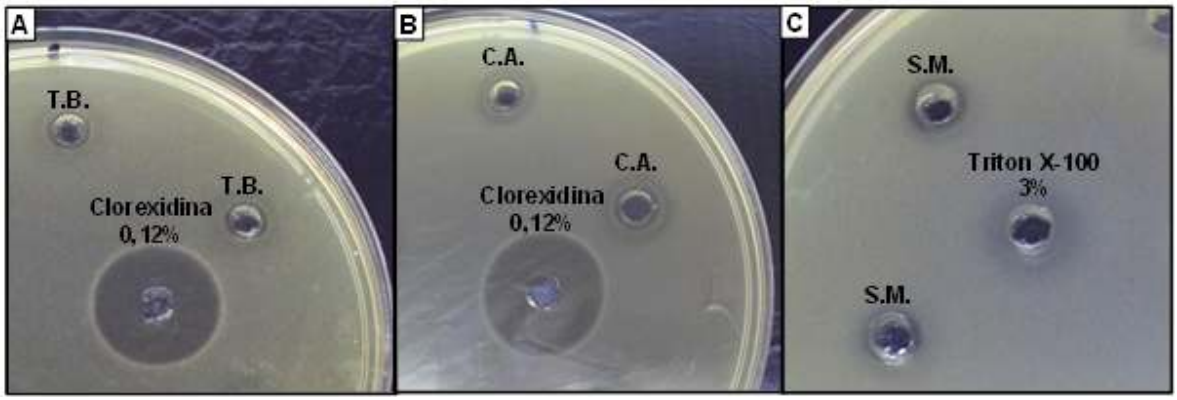


Figura 9 - Teste de difusão em ágar do extrato aquoso de talo de brócolis (T.B.) (A), extrato aquoso de casca de abóbora moranga (C.A.) (B) e extrato clorofórmico de semente de mamão (S.M.)

2.3.3 Microtécnica para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Os extratos que apresentaram resultados positivos no teste de difusão em ágar foram submetidos ao método de diluição seriada em microplaca para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM) frente ao microrganismo *Listeria monocytogenes*. Os resultados obtidos para a CIM e CBM encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos frente à *Listeria monocytogenes*

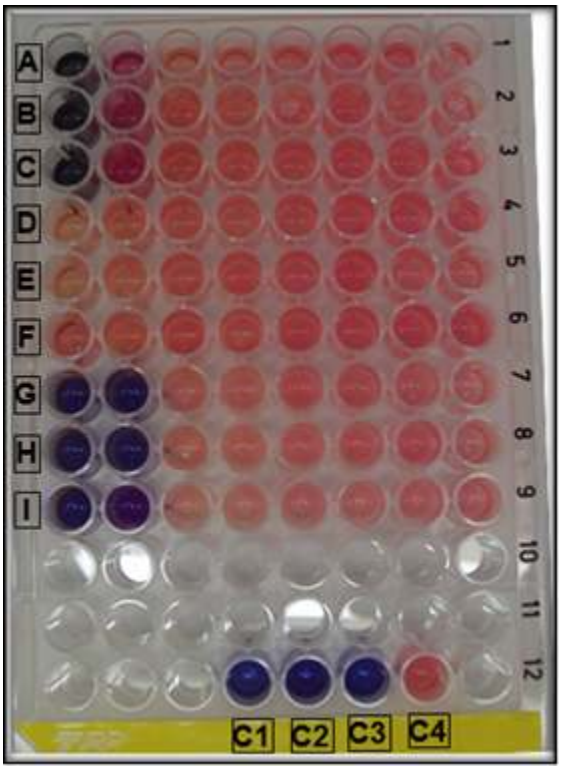
Extrato	CIM*	CBM*
Extrato aquoso de talo de brócolis	102,4	>102,4
Extrato aquoso de casca de abóbora moranga	>102,4	>102,4
Extrato clorofórmico de semente de mamão	6,4	>12,8

*Valores expressos em mg/mL.

Dentre os extratos testados nesta análise, apenas o extrato clorofórmico de semente de mamão foi preparado utilizando-se o tensoativo Tween 80 a 0,04% (v/v).

Foram realizados vários testes buscando definir a CIM e CBM para os extratos que apresentaram resultados positivos no teste de difusão. A maior concentração testada para os extratos aquosos de casca de abóbora moranga e talo de brócolis foi de 102,4 mg/mL. Nesta concentração, foi encontrado um valor de CIM apenas para o extrato de talo de brócolis, não sendo encontrado um valor de CBM. Não foi possível repetir a análise utilizando maiores concentrações destes extratos, pois excederia o limite de solubilização dos mesmos, gerando precipitação e consequentemente levando à apresentação de resultados incoerentes.

O extrato de semente de mamão foi testado em uma concentração de 12,8 mg/mL e apresentou um valor de CIM de 6,4mg/mL, porém não foi encontrado um valor para a CBM nas concentrações testadas.



Linhas A, B e C: diluição seriada (razão 2) do extrato aquoso de talo de brócolis; Linhas D, E e F: diluição seriada (razão 2) do extrato aquoso de casca de abóbora; Linhas G, H e I: diluição seriada (razão 2) do semente extrato clorofórmico de mamão; C1 – TSB ; C2 – TSB + Tween 80; C3 – TSB inoculado + Clorexidina 0,12% (v/v) (controle positivo); C4 – TSB inoculado + Tween 80 (controle negativo).

Figura 10 - Método de microdiluição em caldo para a avaliação da atividade antimicrobiana (CIM) dos resíduos agroindustriais contra *Listeria monocytogenes*

2.3.4 Citometria de fluxo

Após a realização da microtécnica para a determinação da CIM, foi realizada a análise de citometria de fluxo. Os estratos aquosos de talo de brócolis e casca de abóbora moranga foram testados na concentração de 102,4 mg/mL. O extrato de semente de mamão foi avaliado em três concentrações: 25,6 mg/mL (C1); 12,8 mg/mL (C2) e 6,4 mg/mL (C3).

Através da avaliação de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) das amostras de *L. monocytogenes*, foi evidenciada a região onde a população bacteriana em solução salina se encontrava no gráfico, excluindo artefatos e debris (região R1) (Figura 11A). As amostras incubadas com o controle negativo (TSB inoculado + Tween 80) demonstraram

a mesma morfologia do grupo controle em solução salina (Figura 11B). Ao contrário dos grupos controle, as amostras incubadas com os extratos alteraram sua morfologia, resultando em uma alteração de tamanho e granulosidade (Figura 11C-F). Duas diferentes regiões no gráfico foram analisadas: região R2 - aumento de granulosidade (Figura 11C-F) e região R3 - aumento de tamanho e granulosidade (Figura 11D-F). As amostras incubadas com o controle positivo (clorexidina 0,12%) apresentaram duas regiões: região R1, onde observou-se um maior percentual da população bacteriana e a região R3, com um baixo percentual de células e com uma morfologia distinta em relação aos extratos estudados (Figura 11C).

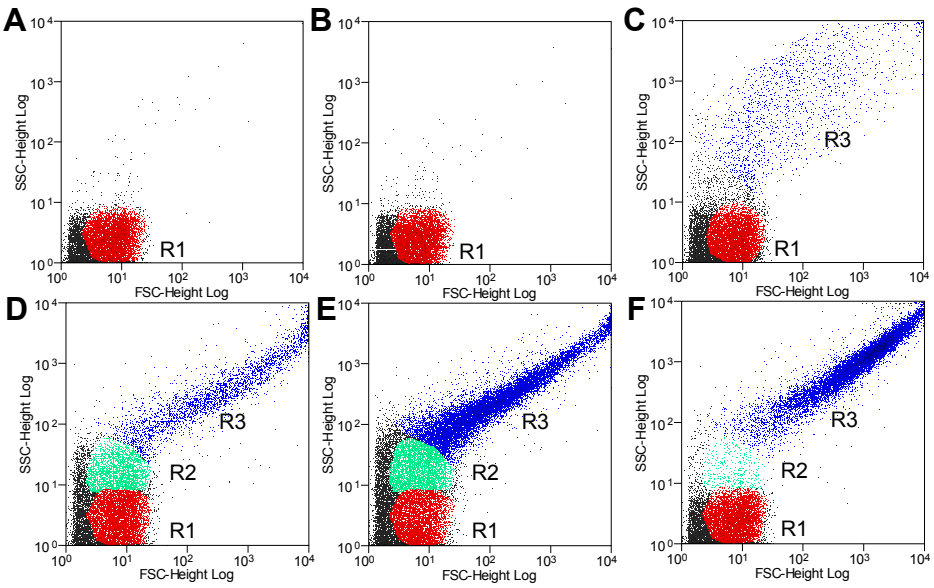


Figura 11 - Gráficos de tamanho (FSC) por granulosidade (SSC) de *Listeria monocytogenes* ATCC7644. Solução salina (A), Tween a 0,04% (B), clorexidina a 0,12%(C), semente de mamão C1 (D), talo de brócolis (E) e casca de abóbora (F). As regiões marcadas com as cores vermelha, verde e azul representam as regiões R1, R2 e R3 respectivamente

A mudança na morfologia das células durante o tratamento com os diferentes extratos forneceu informações importantes sobre possíveis mecanismos de ação. As células que se encontram na região R1 (Figura 11D-F), apresentaram tamanho e granulosidade semelhantes ao controle (Figura 11A). As células que se encontram na região R2, não alteraram o seu tamanho, mas apresentaram-se mais granulosas pela ação dos extratos (Figura 11D-F). Na região R3 pôde-se observar um aumento de tamanho e granulosidade das células (Figura 11D-F). Inicialmente, um aumento de

tamanho como este, sugere a formação de grumos de células. Esta formação geralmente é aleatória, formam-se aglomerados de células de vários tamanhos, como pode ser observado no gráfico da clorexidina (Figura 11C). Durante o tratamento com os extratos, observou-se um aumento de tamanho e granulosidade (região R3), sugerindo dois possíveis eventos: ou as células bacterianas aumentaram de tamanho e ficaram mais granulosas ou bactérias em diferentes estados fisiológicos (vivas, mortas e injuriadas) formaram grumos de células. Assim, para avaliar a população de *L. monocytogenes* dessa região, foi realizada a análise dos gráficos de altura por largura de fluorescência da região R3 do gráfico de tamanho por granulosidade, descrito no item 2.2.6.3. Através desta análise foi possível excluir os grumos e obter o percentual de células individuais. O valor real do percentual de eventos de células individuais foi inferior a 50% do total da região R3 em todos os extratos testados (Tabela 7), mostrando claramente que uma das ações desses extratos à *L. monocytogenes* foi a formação de grumos de células.

Tabela 7 - Análise da região R3 do gráfico tamanho por granulosidade de *Listeria monocytogenes* ATCC7644 nos diferentes extratos

	Total de células (%)			Células (%)		
Extratos	1 hora	3 horas	5 horas	1 hora	3 horas	5 horas
Semente de mamão C1	12,7	16,0	-	6,9	8,2	-
Semente de mamão C2	6,8	8,5	-	3,8	4,6	-
Semente de mamão C3	6,0	7,0	-	0,5	0,3	-
Talo de brócolis	41,0	50,0	19,0	12,0	9,5	1,9
Casca de abóbora	33,0	7,0	7,0	21,0	5,0	0,2

Os percentuais das regiões R1 e R2 de cada extrato, do gráfico de tamanho por granulosidade, foram somados e comparados ao percentual da região R3 do respectivo extrato (Figura 12). Durante o tratamento com o extrato de semente de mamão C1, observou-se que após 1 e 3 horas o percentual de células na região R3 foi cerca de 22%, porém após 5 horas de incubação essa população não foi mais observada. Semelhantemente, durante o tratamento com o mesmo extrato na concentração C2, o percentual de células nesta região diminui para cerca de 12% nas primeiras 3 horas, desaparecendo após 5 horas de tratamento. No tratamento com o extrato de semente de mamão C3 esta região não foi observada (Figura 12B). Nota-se, através dos valores

encontrados, uma relação entre a concentração do extrato utilizada e o tempo de incubação.

Durante o tratamento com o extrato de casca de abóbora observou-se após 1 hora de incubação um percentual de células de 57% na região R3. Esta população diminuiu ao longo do tempo, desaparecendo após 5 horas de tratamento (Figura 12).

Durante o tratamento com o extrato de talo de brócolis observou-se após 1 e 3 horas um percentual de células de cerca de 44% na região região R3, representando apenas 8% após 5 horas de tratamento (Figura 12).

Comparando-se os três extratos testados (Figura 12B), observou-se entre eles uma grande diferença no percentual de células nessa região. As células tratadas com os extratos aquosos de talo de brócolis e casca de abóbora apresentaram um percentual de células injuriadas cerca de 3 vezes maior do que o extrato de semente de mamão (Tabela 7).

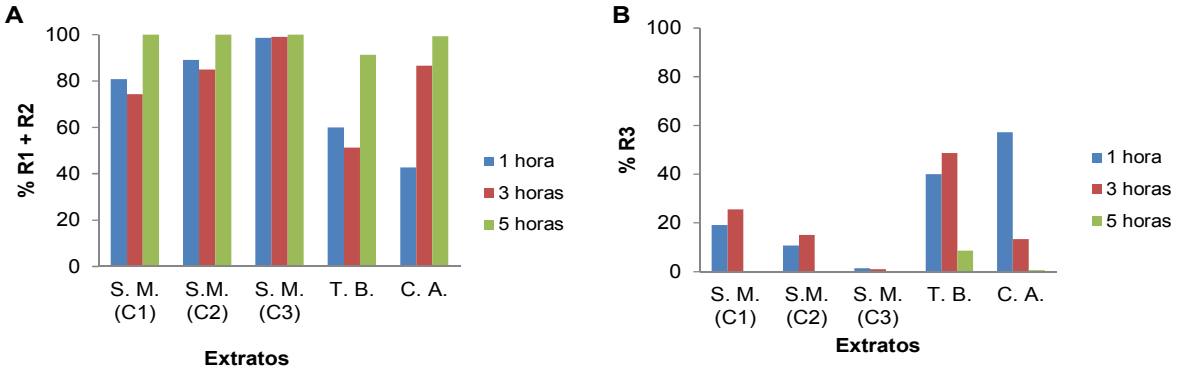


Figura 12 - Representação das regiões R1+R2 (A) e R3 (B) dos gráficos de tamanho por granulosidade de *Listeria monocytogenes* ATCC7644 após tratamento com semente de mamão C1 (S.M.C1), semente de mamão C2 (S.M.C2), semente de mamão C3 (S.M.C3), casca de abóbora (C.A.) e talo de brócolis (T.B.) em 1, 3 e 5 horas

As regiões delimitadas nos gráficos de tamanho por granulosidade: R1, R2 e R3 foram plotadas em novos gráficos e analisadas quanto à intensidade de fluorescência para os fluorocromos cFDA e PI (Figuras 13 e 14). Como as regiões R1 e R2 do gráfico de tamanho por granulosidade de todos os extratos apresentaram o mesmo percentual de fluorescência para cFDA e PI, as duas populações foram analisadas em conjunto (Figura 13). Ao contrário, a região R3 do gráfico de tamanho por granulosidade apresentou um

percentual de fluorescência distinto das regiões R1 e R2. Por ser uma marcação muito peculiar, a demonstração desta região foi realizada separadamente (Figura 14). O uso combinado dos dois fluorocromos revelou a presença de quatro diferentes regiões com células marcadas: $cF^{+}PI^{-}$ (com atividade de esterase ativa e com a membrana intacta), $cF^{-}PI^{+}$ (atividade da esterase não detectada e membrana comprometida), $cF^{+}PI^{+}$ (esterase ativa com membrana minimamente danificada) e $cF^{-}PI^{-}$ (ausência de atividade da esterase, mas com a membrana celular intacta). Estas marcações representam diferentes estados fisiológicos das células bacterianas: células vivas, mortas, injuriadas e "obscuras", respectivamente.

Na análise de fluorescência das regiões R1 e R2, observou-se após uma hora de tratamento, que nas amostras tratadas com o extrato de semente de mamão, nas diferentes concentrações, o percentual de células vivas foi semelhante ao controle, cerca de 50%; para os extratos de casca de abóbora e talo de brócolis, este percentual representou cerca de 29% e 33% respectivamente. A presença de uma subpopulação de células injuriadas nestas regiões mostrou-se distinta entre os extratos representando 2,5%, 3,4% e 2,6% para o extrato de semente de mamão nas concentrações C1, C2 e C3 concomitantemente, 19,7% para o extrato de casca de abóbora e 6,3% para o extrato de talo de brócolis. A subpopulação de células mortas foi de 2,08%, 1,14%, 8,45%, 10,75% e 1,6% para os extratos de semente de mamão (nas concentrações C1, C2 e C3), casca de abóbora e talo de brócolis respectivamente. Após 3 horas de tratamento, houve uma redução das populações de células injuriadas e de células mortas para todos os extratos testados. Para os extratos de casca de abóbora e talo de brócolis observou-se que após 5 horas de tratamento houve um aumento destas subpopulações, nestas regiões (R1 e R2).

Durante a análise foi utilizado um controle positivo (aquecimento a 70ºC por 30 minutos) como descrito por Paparella et al. (2008). Porém, diferentemente dos resultados encontrados por Paparella et al. (2008), neste trabalho a enzima esterase apresentou uma funcionalidade considerável (Figura 13B). Bunthof et al. (1999) analisando *Lactococcus lactis* em diferentes condições de estresse verificaram que menos de 0,1% das células sobreviveram ao aquecimento a 60^{0}C, porém mais de 95% apresentaram marcação para cF

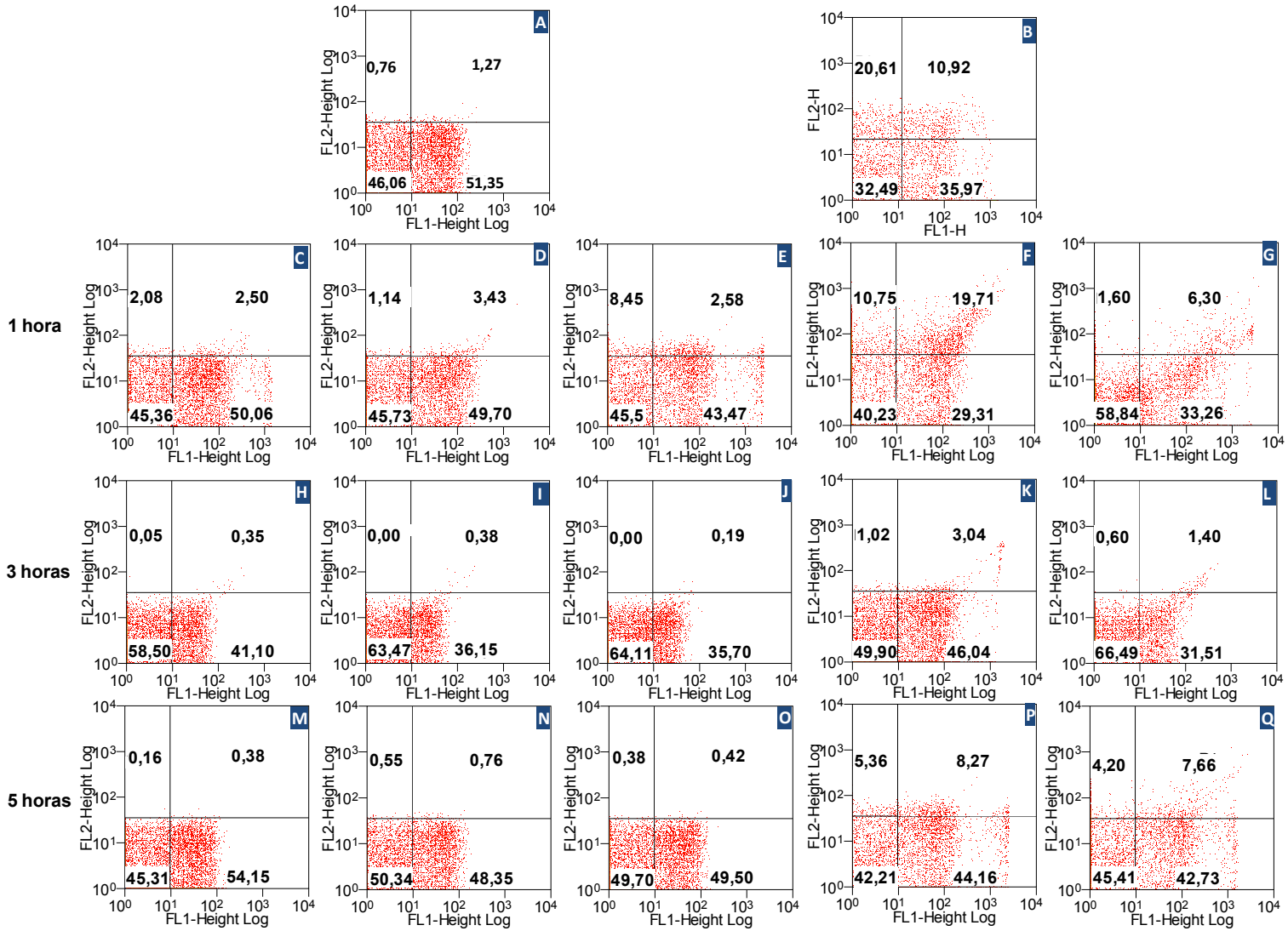


Figura 13 - Gráficos de fluorescência de FL1 (cF) por FL2 (PI) de *Listeria monocytogenes* ATCC7644, após tratamento com semente de mamão C1 (C, H, M), semente de mamão C2 (D, I, N), semente de mamão C3 (E, J, O), casca de abóbora (F, K, P) e talo de brócolis (G, L, Q) em 1, 3 e 5 horas. Solução salina (A); aquecimento a 70^{0}C por 30 minutos (B)

Na análise de fluorescência da região R3, observou-se que grande parte da população se caracterizou por células injuriadas, em todos os extratos testados (Figura 14). Estes resultados mostram que a maior parte da população de células, nessa região (caracterizadas por um aumento de tamanho e granulosidade), ainda estão vivas, porém com abertura de poros na membrana. É importante destacar que essas células só foram evidenciadas no tratamento com o extrato de semente de mamão nas concentrações C1 e C2 após 1 e 3 horas de incubação (Figura 14A-D), não sendo identificadas quando tratadas à concentração C3 deste mesmo extrato (dados não mostrados). Nos tratamentos com os extratos de casca de abóbora e talo de brócolis essas células foram observadas após 1, 3 e 5 horas de incubação.

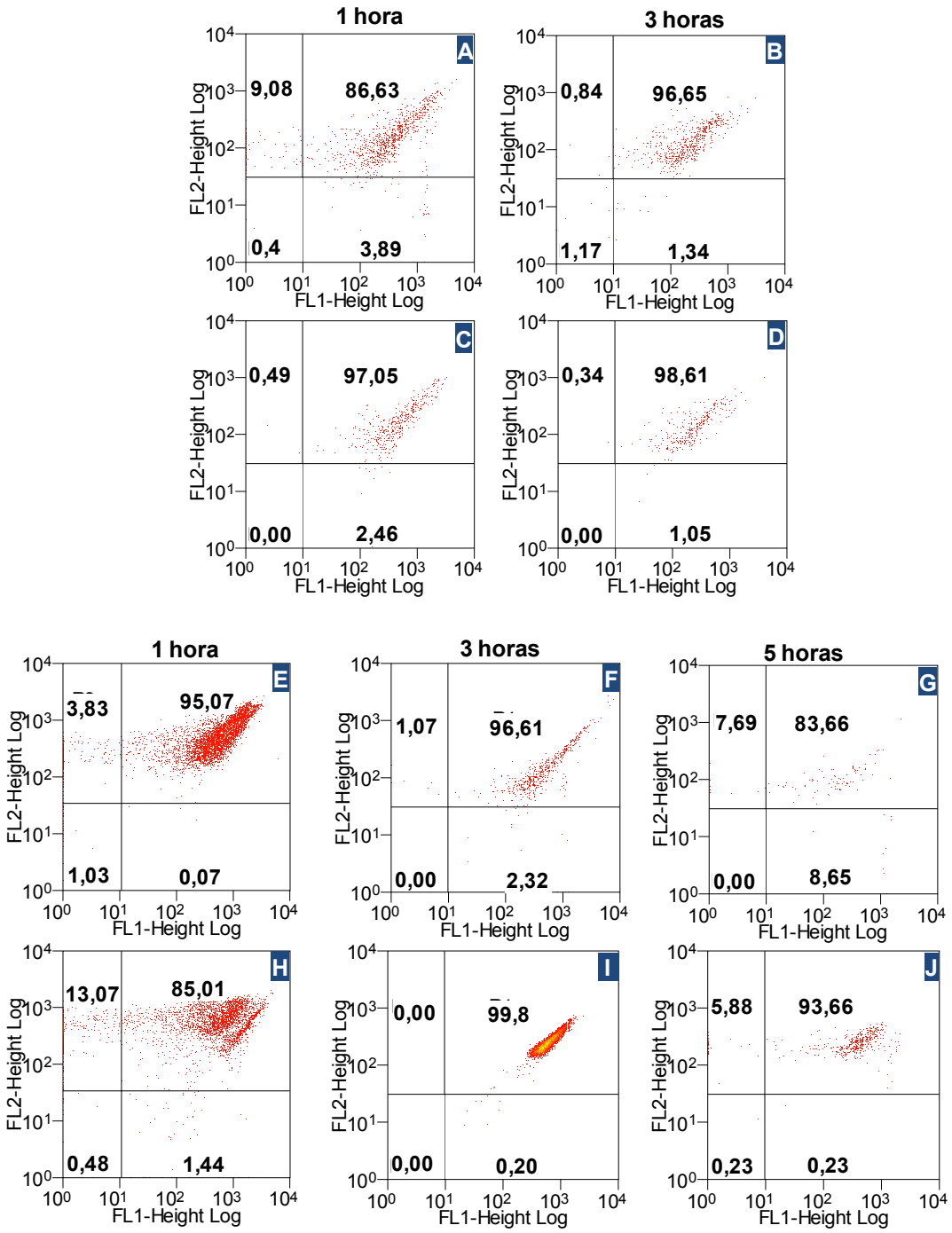


Figura 14 - Gráficos de fluorescência de FL1 (cF) por FL2 (PI) de *Listeria monocytogenes* ATCC7644 após tratamento com semente de mamão C1 (A e B), semente de mamão C2 (C e D), casca de abóbora (E-G) e talo de brócolis (H-J) em 1, 3 e 5 horas

Os gráficos de fluorescência apresentaram diferentes estados fisiológicos da *L. monocytogenes* (Figuras 13 e 14) submetida aos tratamentos com os diferentes extratos. Nos três extratos testados, notou-se um padrão de fluorescência peculiar nas difererentes

regiões (R1+R2 e R3). Esses dados, adicionados à informação do percentual de células de cada região, são importantes para compreender o mecanismo de ação dos extratos. Contudo, é necessário avaliar o perfil de marcação dos fluorocromos na populacão total de bactérias por amostra. Sendo assim, realizou-se uma análise de fluorescência das regiões (R1+R2+R3) dos três extratos estudados (Figura 15).

Foram observadas diferenças nas respostas celulares entre os extratos, em função das subpopulações identificadas. No tratamento com o extrato de semente de mamão, nas três concentrações C1, C2 e C3, a subpopulação de células mortas, após 1 hora de tratamento, representou 3,42%, 1,07% e 8,45% respectivamente, e após 3 horas essa população praticamente não foi identificada. A subpopulação de células injuriadas foi de 18,65%, 13,54% e 2,58%, após 1 hora de tratamento, para as concentrações C1, C2 e C3 concomitantemente, em 3 horas esta população manteve-se (havendo um pequeno acréscimo nas concentrações C1 e C2), em 5 horas houve uma drástica redução, representando menos de 1% para as três concentrações testadas. A subpopulação de células vivas, em 1 hora de tratamento, representou 41,20%, 44,60% e 43,47% para as concentrações C1, C2 e C3, respectivamente, após 3 horas houve um decréscimo desta população para 30,92%, 30,89% e 35,70%, porém houve um aumento após 5 horas de tratamento, com percentuais de 54,15%, 48,35% e 49,50%.

A subpopulação de células mortas para os extratos de casca de abóbora e talo de brócolis, após 1 hora de tratamento, foi de 8,16% e 7,98% respectivamente, após três horas verificou-se uma redução desta subpopulação, aumentando, após 5 horas de tratamento, para 4,21% e 5,56%. A subpopulação de células injuriadas, em 1 hora de tratamento foi de 51,32% para o extrato de casca de abóbora e de 49,85% para o extrato de talo de brócolis. Houve uma redução da subpopulação tratada com o extrato de casca de abóbora ao longo do tempo, porém para o extrato de talo de brócolis, este percentual manteve-se, após 3 horas, representando 48,61%, reduzindo em 5 horas para 8,18%. O extrato de casca de abóbora apresentou uma grande redução na subpopulação de células vivas em 1 hora de tratamento chegando a 15,06%, porém em 3 horas este percentual aumentou para 27,31%, e em 5 horas para 42,48%. O extrato de talo de brócolis, assim como o extrato de casca de abóbora, apresentou, após 1 hora de tratamento, em torno de

17,61% de células vivas, ocorreu um aumento após 3 horas para 24,75%, e após 5 horas esse valor chegou a 41,07%.

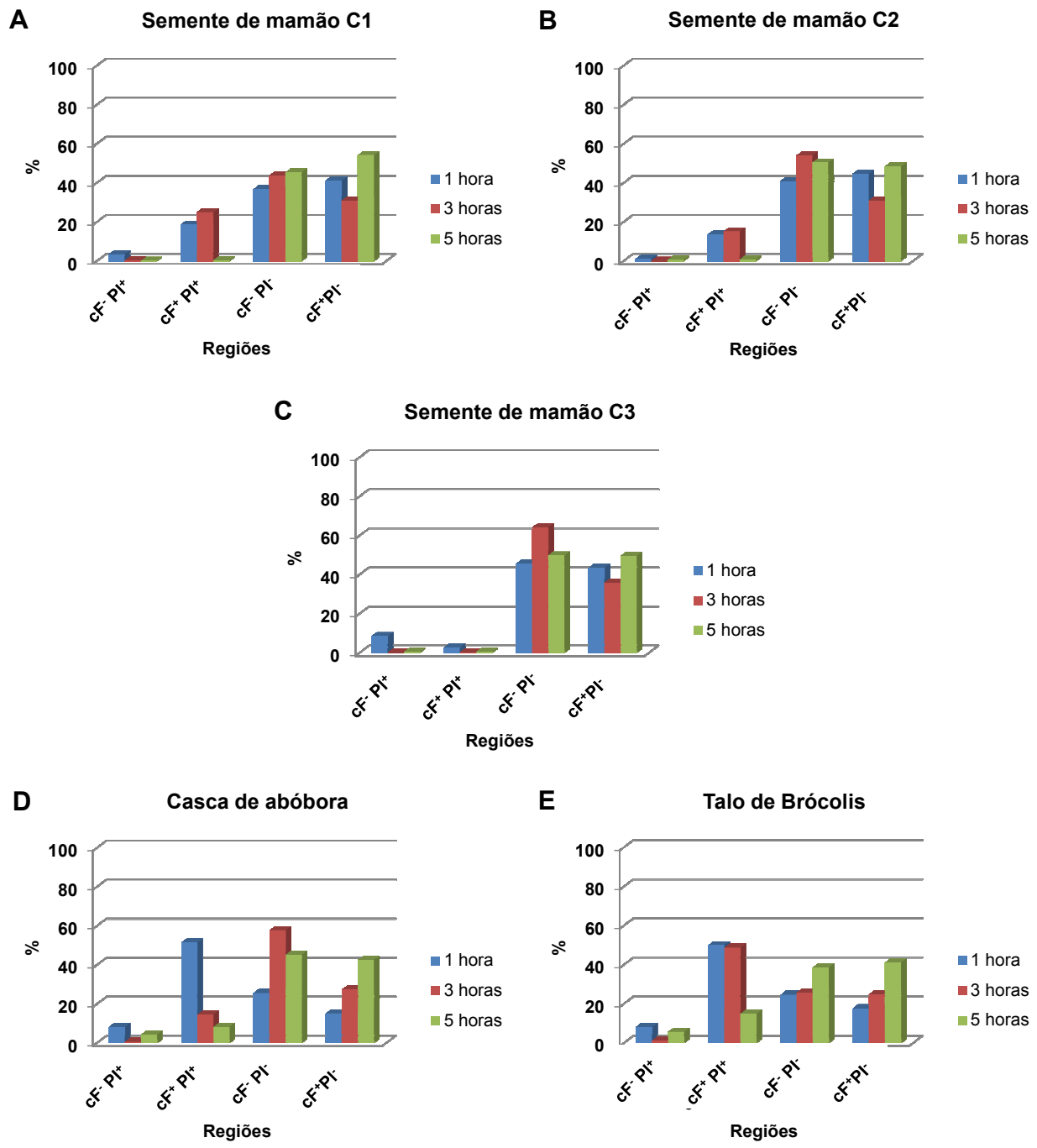


Figura 15 - Gráfico de fluorescência cF por PI da população total de *Listeria monocytogenes* ATCC7644 após tratamento com semente de mamão C1 (A), semente de mamão C2 (B), semente de mamão C3 (C), casca de abóbora (D) e talo de brócolis (E) em 1, 3 e 5 horas

Considerando a enzima esterase como um marcador de vitalidade das células, observou-se que durante o tratamento com os extratos houve uma redução da atividade da enzima em função do tempo e do extrato analisado. Após 5 horas de tratamento nota-se um aumento da atividade enzimática para todos os extratos testados (Figura 16).

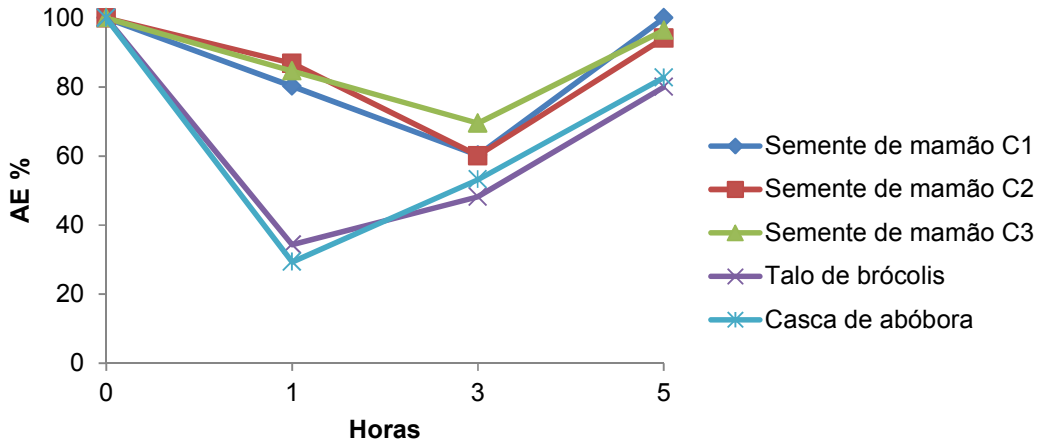


Figura 16 - Efeito dos extratos sobre a atividade da enzima esterase de *Listeria monocytogenes* ATCC7644

2.3.5 Composição química dos extratos por CG-EM

Após a constatação da atividade antimicrobiana dos extratos de talo de brócolis, casca de abóbora e semente de mamão, foi analisado o perfil cromatográfico dos mesmos para a avaliação da composição química e identificação dos possíveis compostos responsáveis por essa atividade.

Os extratos de talo de brócolis e casca de abóbora foram purificados em cartucho SPE-LC18, com o intuito de isolar os analitos de interesse presentes na matriz, removendo, desta forma, substâncias que pudessem mascarar ou impedir a identificação dos compostos. Em seguida, todos os três extratos foram silanizados com TMS para posterior análise através da técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM).

Dentre os compostos identificados no extrato de talo de brócolis (Tabela 8), que podem ser responsáveis pela atividade antimicrobiana do extrato, destacam-se alguns

ácidos fenólicos (ferúlico, sinápico e caféico), o ácido málico e o ácido ascórbico, este último representando cerca de 24,79% da área total dos picos indicados (Figura 17).

Entre os compostos identificados no extrato de casca de abóbora (Tabela 9), que podem ser responsáveis pela atividade antimicrobiana do extrato, destacam-se os ácidos fenólicos (*p*-cumárico e ferúlico) e alguns ácidos orgânicos (málico, maléico e cítrico). Verificou-se também a presença de aminoácidos essenciais, como a fenilalanina e o triptofano, representando uma boa parte dos picos identificados no cromatograma (Figura 18).

No extrato de semente de mamão (tabela 10) o benzil-isotiocianato, presente na amostra, representou 10,86% da área total dos picos indicados. Verificou-se também a presença de ésteres de ácidos graxos representando uma boa parte dos compostos identificados no cromatograma (Figura 19).

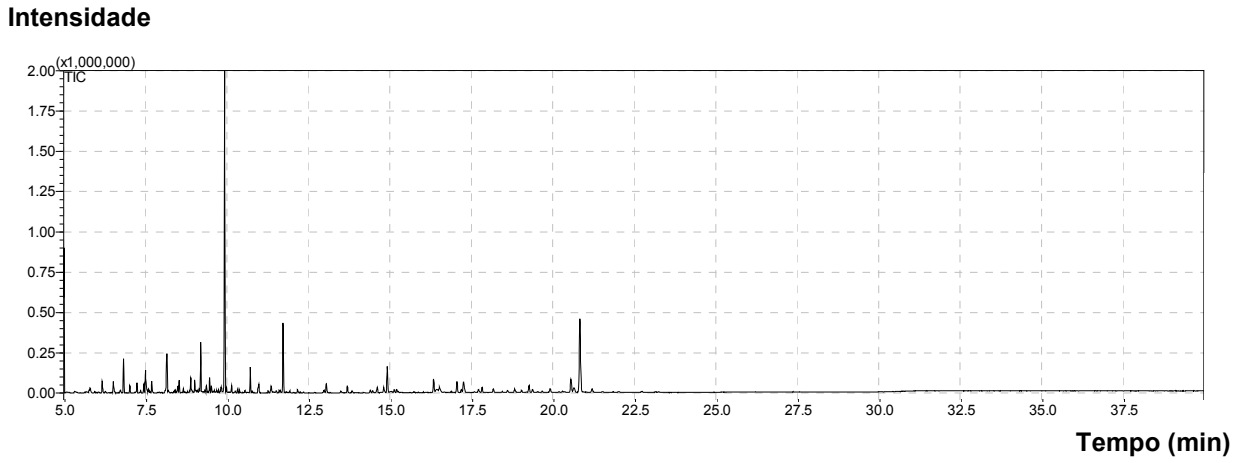


Figura 17 - Perfil cromatográfico do extrato aquoso de talo de brócolis

Tabela 8 - Tempo de retenção, porcentagem dos compostos e íons do espectro de massas dos principais compostos silanizados presentes no extrato aquoso de talo de brócolis pela análise de CG-EM

Composto / íon (m/z) abundância em parênteses	T.R.	Área (%)
73 (100), 75 (30), 147 (33), 228 (84), 243 (4)	6,83	2.55
Ácido málico	7,24	0.92
73 (100), 103 (43), 127 (17), 172 (18), 209 (3)	7,50	3.47
73 (63), 140 (100), 192 (36), 218 (60), 267 (2)	8,15	5.05
Ácido p-Phenylbenzoic	9,20	3.99
Ácido ascórbico	9,93	24.79
Ácido ferúlico	10,72	2.02
Ácido caféico	10,98	1.16
Ácido sinápico	11,73	6.33
73 (100), 255 (34), 307 (97), 345 (54), 771 (2)	20,84	11.04

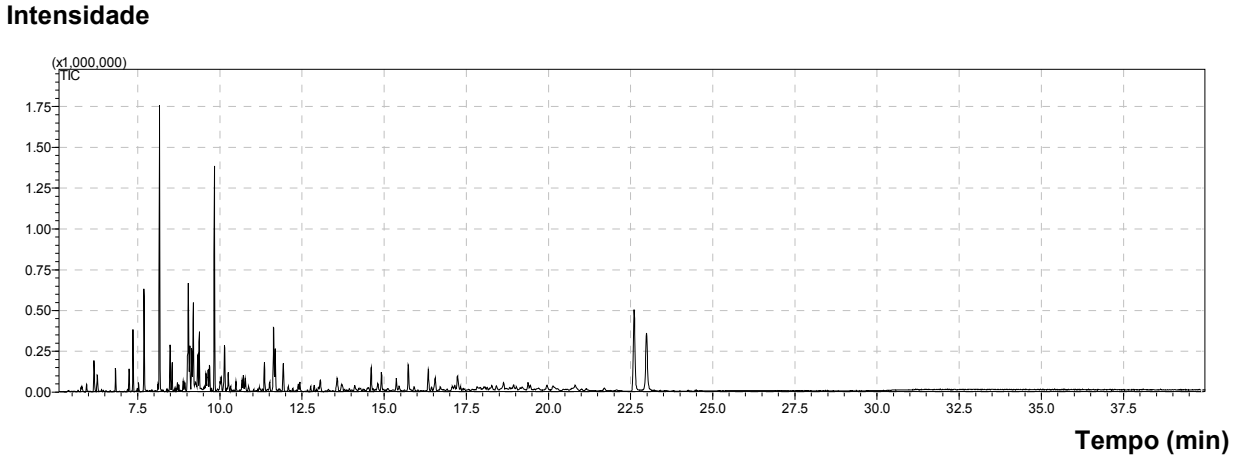


Figura 18 - Perfil cromatográfico do extrato aquoso de casca de abóbora

Tabela 9 - Tempo de retenção, porcentagem dos compostos e íons do espectro de massas dos principais compostos silanizados presentes no extrato aquoso de casca de abóbora pela análise de CG-EM

Composto / íon (m/z abundância em parênteses)	T.R.	Área (%)
Ácido maléico	6,26	0.95
Ácido málico	7,24	0.83
P-hydroxybenzyl alcohol 2tms	7,35	2.44
Fenilalanina	7,70	4.44
Fenilalanina	8,16	11.67
Isocitric lactone 2tms	8,48	1.93
Ácido p-cumárico	9,04	6.22
Ácido cítrico	9,19	4.30
Ácido p-cumárico	9,83	9.26
Ácido pantotênico	10,14	2.50
Ácido ferúlico	10,71	0.69
Triptofano	11,64	3.66
73 (100), 103 (38), 217 (40), 295 (47), 296 (57), 324 (41), 702 (2)	22,60	8.25
73 (100), 103 (35), 217 (62), 223 (39), 224 (47), 629 (2)	22,98	6.16

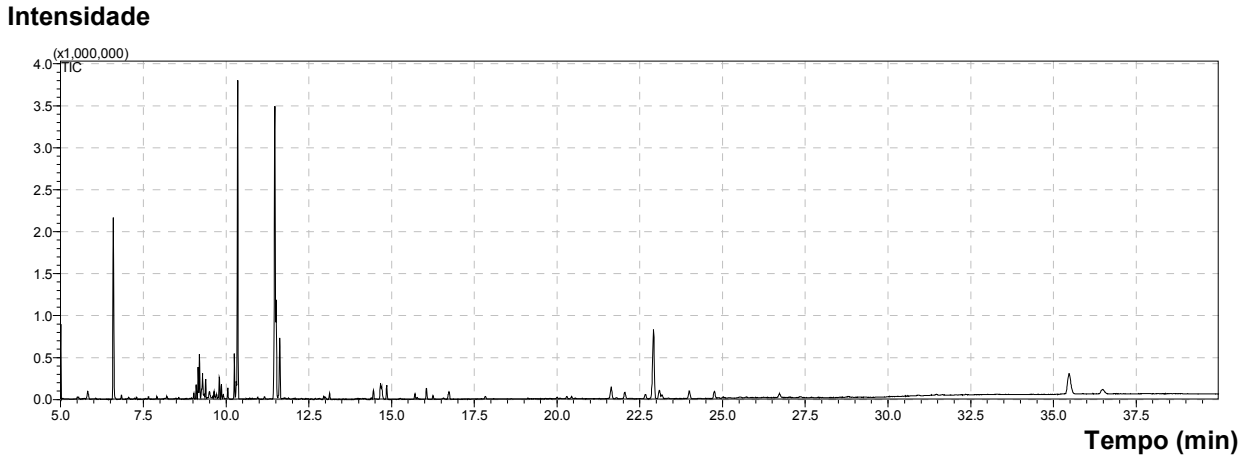


Figura 19 - Perfil cromatográfico do extrato clorofórmico de semente de mamão

Tabela 10 - Tempo de retenção, porcentagem dos compostos e íons do espectro de massas dos principais compostos silanizados presentes no extrato clorofórmico de semente de mamão pela análise de CG-EM

Composto / íon (m/z abundância em parênteses)	T.R.	Área (%)
Benzil-isotiocianato	6,59	10.86
Ácido hexadecanóico	10,35	16.58
Ácido oléico	11,47	24.88
Estigmasterol	22,91	8.21

2.3.6 Discussão

Durante o *screening*, realizado através do teste de difusão em ágar, apenas três extratos apresentaram formação de halo de inibição frente o microrganismo *Listeria monocytogenes*: os extratos aquosos de casca de abóbora e talo de brócolis e o extrato clorofórmico de semente de mamão. Diferentemente do que foi encontrado neste estudo, alguns dos resíduos testados tiveram sua atividade antimicrobiana apontada nos seguintes trabalhos: Al-Habib et al. (2010) demonstraram a atividade antibacteriana de extratos de sementes e peles de uva (*Vitis vinifera*) contra *Staphylococcus aureus*, resistentes à meticilina. Baydar et al. (2004) testaram extratos de bagaço e semente de uva (*Vitis vinifera*) e verificaram que os extratos de bagaço de uva não apresentaram atividade antimicrobiana, porém os de sementes de uva nas concentrações de 4% e 20% apresentaram atividade antibacteriana contra diversas bactérias, dentre elas, *Escherichia coli* DM, *Listeria monocytogenes* Scott A, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* COWAN. Sousa et al. (2008) investigaram a atividade antimicrobiana em três espécies do gênero *Brassica*, dentre elas, couve, couve tronchuda e nabo, e constataram que suas inflorescências apresentam uma variedade de substâncias fenólicas e ácidos orgânicos, e que a atividade antimicrobiana dessas espécies mostrou-se eficaz somente para bactérias Gram positivas, dentre elas *Staphylococcus aureus*. A diversidade nos resultados para a análise antibacteriana pode ser atribuída a diversos fatores como o método e o solvente de extração, o microrganismo testado e a composição química das amostras (BAYDAR; ÖZKAN; SAĞDIÇ, 2004; JAYAPRAKASHA; SELVI; SAKARIAH, 2003). Ayaz et al. (2008)

verificaram que a maioria dos compostos fenólicos encontrados em folhas e sementes de couve apresenta-se fortemente ligados à matriz. É importante destacar também que a presença de alguns compostos como lipídeos, proteínas e açúcares, pode interferir negativamente no resultado final da análise.

Os extratos que apresentaram resultado positivo para o teste de difusão em ágar seguiram para as análises de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM). Estas análises foram realizadas com a finalidade de avaliar a eficácia antimicrobiana dos extratos contra o microrganismo *L. monocytogenes* ATCC7644. Os resultados demonstraram que os extratos de talo de brócolis e semente de mamão apresentaram atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes*, porém os dados encontrados apontam apenas uma ação bacteriostática. A realização de novos testes, utilizando maiores concentrações dos extratos, não foi possível devido ao limite de solubilização na elaboração dos mesmos, sendo assim não foram encontrados valores de CBM para nenhum dos extratos testados. Após a realização da CIM, prosseguiu-se para a análise de citometria de fluxo, onde os extratos de talo de brócolis, casca de abóbora e semente de mamão foram avaliados, sendo este último testado em três concentrações: 25,6 mg/mL (C1); 12,8 mg/mL (C2) e 6,4 mg/mL (C3).

A análise de citometria de fluxo demonstrou alterações na morfologia das células, frente aos extratos testados, através da análise do tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). A avaliação das diferentes regiões encontradas (R1+R2 e R3) permitiu identificar e diferenciar a ação dos extratos sobre as células, bem como constatar a formação de aglomerados (grumos de células). Obteve-se uma discriminação entre células intactas e permeabilizadas, através do acompanhamento das marcações dos corantes cF e PI acumulados nas células durante os tratamentos com os extratos.

Neste estudo, a análise de citometria de fluxo destacou as mudanças que ocorreram na população de *L. monocytogenes*, ressaltando além da mudança de morfologia, a heterogeneidade fisiológica da população celular. As subpopulações encontradas ressaltam a ação dos extratos sobre as células, revelando a presença de células viáveis, mortas e injuriadas. Nota-se, em função do percentual de células lesadas encontrado, que a principal aplicação dos extratos analisados seria em função

da inibição do crescimento do microrganismo e da redução de sua população. Estas informações confirmam os resultados encontrados na análise para a determinação da CIM, demonstrando um efeito bacteriostático do extrato sobre as células. Yousef e Courtney (2003), afirmam que o estresse microbiano pode implicar em danos aos componentes celulares e consequentemente, prejudicar o seu crescimento reprodutivo. Estes microrganismos são em geral, descritos como células injuriadas podendo se recuperar ou morrer. Segundo Paparella et al. (2008) células injuriadas, em geral, adotam um estado latente em que não crescem, mas permanecem vivas podendo se recuperar e voltar à condição de fisiologicamente ativas.

Os compostos de interesse (compostos fenólicos, glucosinolatos e ácidos orgânicos), presentes nos extratos, foram identificados através da análise de CG-EM e são considerados os principais responsáveis pela atividade antimicrobiana dos extratos. No extrato de talo de brócolis foram encontrados os ácidos ferúlico, caféico e sinápico; no extrato de casca de abóbora foram encontrados os ácidos ferúlico e *p*-cumárico e no extrato de semente de mamão foi encontrado o benzil-isotiocianato.

Dentre os ácidos fenólicos encontrados no extrato de talo de brócolis, o ácido sinápico foi o principal, representando 6,33% do total de compostos identificados na análise de CG-EM. O ácido sinápico, juntamente com o ácido caféico, foi um dos principais ácidos fenólicos encontrados por Llorach (2003) em couve-flor e por Ayaz et al. (2008) em folhas e sementes de couve (vegetais pertencentes à família do brócolis, família *Brasicaceae*).

O ácido *p*-cumárico representou 15% do total de compostos identificados no extrato de casca de abóbora por CG-EM. A atividade antimicrobiana do ácido cumárico e outros compostos fenólicos foi relatada por Puupponen-Pimiä et al. (2001), que demonstraram que os ácidos fenólicos cinâmico, cumárico, caféico e ferúlico, testados isoladamente, inibiram *Escherichia coli* e *Salmonella enterica* em altas concentrações (500 µg/ml). Wen et al. (2003) reportaram a atividade de ácidos hidroxicinâmicos (cinâmico, p-cumárico, caféico e ferúlico) contra *L. monocytogenes*, com valores de CIM entre 0,20% e 0,27% m/v. Os experimentos de Wen et al. (2003) revelaram também a influência do pH na atividade antibacteriana, demonstrando que os ácidos hidroxicinâmicos exibiram um efeito bacteriostático em pH 6,5, porém apresentaram um

efeito bactericida em pH 4,5. A atividade antimicrobiana dos ácidos fenólicos tem sido apontada como fortemente influenciada pelo pH do meio, devido à redução do número de moléculas de ácido dissociadas em solução, com o abaixamento do pH (WEN et al., 2003; RAMOS-NINO et al., 1997). Os ácidos hidroxicinâmicos podem ter o seu transporte facilitado através da membrana celular, se comparado aos ácidos hidroxibenzóicos correspondentes, devido à presença de sua cadeia lateral propenóica. A presença desta cadeia lateral confere a estes compostos um caráter muito menos polar, propriedade que facilita a entrada do composto através da célula bacteriana, fato que pode estar relacionado ao forte efeito inibitório deste grupo de compostos (RODRÍGUEZ VAQUERO; ALBERTO; NADRA, 2007).

O mecanismo de ação dos compostos fenólicos ainda não está totalmente elucidado, porém acredita-se que a sua ação possa estar relacionada ao rompimento da parede celular. Supõe-se ainda que eles interajam com enzimas microbianas afetando a atividade enzimática ou ainda provocando a desnaturação de proteínas. Este fato pode ser evidenciado através dos resultados encontrados na análise de citometria de fluxo, para os extratos de talo de brócolis e casca de abóbora, em que o rompimento da parede e o extravasamento do material celular podem ser a causa da formação de aglomerados de tamanhos variados, constituídos de células em diferentes estados fisiológicos. Estes aglomerados representaram mais de 50% do total de eventos analisados nestes extratos após 1e 3 horas de tratamento.

Os resultados obtidos para o extrato de semente de mamão demonstram uma ação menos invasiva deste extrato em comparação aos demais extratos testados. Sugere-se então que o aumento no tamanho das células foi provocado por danos leves à membrana celular e estes danos provocaram a perda do controle osmótico, causando como consequência, a entrada excessiva de líquido no interior da célula. O mecanismo de ação proposto para os isotiocianatos está relacionado à reações com proteínas microbianas e clivagem de ligações dissulfeto (DELAQUIS; MAZZA, 1995). Lin, Preston e Wei (2000) verificaram que os alil isotiocianatos podem aumentar o vazamento de metabólitos intracelulares em *Escherichia coli* O157:H7 e *Salmonella* Montevideo, indicando danos à membrana celular bacteriana.

3 CONCLUSÕES

Entre os resíduos testados apenas três apresentaram atividade antimicrobiana contra a *L. monocytogenes*, foram eles: extratos aquosos de casca de abóbora moranga e talo de brócolis e extrato clorofórmico de semente de mamão.

A avaliação da composição química demonstrou a presença dos ácidos fenólicos ferúlico, caféico e sinápico no extrato de talo de brócolis, os ácidos fenólicos ferúlico e *p*-cumárico no extrato de casca de abóbora e no extrato de semente de mamão foi encontrado o benzil-isotiocianato.

A análise de citometria de fluxo combinada com a técnica de fluorescênicia foi extremamente útil para aprimorar a compreensão dos efeitos dos resíduos agroindustriais sobre o microrganismo *L. monocytogenes*, permitindo discriminar células viáveis, injuriadas e mortas. Diante dos resultados encontrados, foram constatadas diferenças na atividade antimicrobiana dos extratos, sugerindo que a ação do extrato de semente de mamão foi menos intensa sobre a *L.monocytogenes* do que os demais extratos testados, nas condições em que a análise foi realizada.

A identificação de células injuriadas é de extrema importância na indústria de alimentos, pois esta subpopulação pode ser crítica se estas células se recuperarem. Este enfoque pode ser muito importante, principalmente em estudos de *L. monocytogenes*, tendo em vista o impacto desta bactéria sobre os grupos de risco.

Diante da dificuldade em evitar a contaminação de alimentos por *L. monocytogenes*, a utilização de compostos antimicrobianos naturais derivados de resíduos agroindustriais se mostra promissora e pode ser uma alternativa para auxiliar na segurança dos alimentos.

REFERÊNCIAS

AKIYAMA, H.; FUJII, K.; YAMASAKI, O.; OONO, T.; IWATSUKI, K. Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 48, n. 4, p. 487–491, Oct., 2001.

ALEXANDRINO, A.M.; FARIA, H.G. de; SOUZA, C.G.M. de; PERALTA, R.M. Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack:Fr). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 2, p. 364-368, Abr./June, 2007.

AL-HABIB, A; AL-SALEH, E.; SAFER, A.; AFZAL, M. Bactericidal effect of grape seed extract on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **The Journal of Toxicological Sciences**, Sendai, v. 35, n. 3, p. 357-364, June, 2010.

ÁLVAREZ-BARRIENTOS, A.; ARROYO, J.; CANTÓN, R.; NOMBELA, C.; SÁNCHEZ-PÉREZ, M. Applications of flow cytometry to clinical microbiology. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 13, n. 2, p. 167-195, Apr., 2000.

ANANTA, E.; HEINZ, V.; KNORR, D. Assessment of high pressure induced damage on *Lactobacillus rhamnosus* GG by flow cytometry. **Food Microbiology**, London, v. 21, n. 5, p. 567–577, Oct., 2004.

ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA 2010. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz. Disponível em: <www.anuarios.com.br>. Acesso em: 14 Fev. 2011.

ANUÁRIO BRASILEIRO DE HORTALIÇAS 2010. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz. Disponível em: <www.anuarios.com.br>. Acesso em: 14 Fev. 2011.

ATLAS DE ENERGIA ELÉTRICA DO BRASIL. 3. ed. Brasília: ANEEL, 2008. Disponível em: <http://www.aneel.gov.br/arquivos/PDF/atlas_par2_cap4.pdf>. Acesso em: 04 Maio 2011.

AYAZ, F.A.; HAYIRHOGLU-AYAZ, S.; ALPAY-KARAOGLU, S.; GRÚZ, J.; VALENTOVÁ, K.; ULRICHOVÁ, J.; STRNAD, M. Phenolic acid contents of kale (*Brassica oleraceae L.* var. *acephala* DC.) extracts and their antioxidant and antibacterial activities. **Food Chemistry**, Barking, v. 107, n. 1, p. 19-25, Mar., 2008.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, Barking, v. 99, n. 1, p. 191-203, July, 2006.

BATISTA, M.T. Taninos. In: CUNHA, A.P. da (Coord.). **Farmacognosia e fitoquímica.** 2. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2009. cap. 14 p.292-316.

BAYDAR, N.G.; ÖZKAN, G.; SAĞDIÇ, O. Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera L.*) extracts. **Food Control**, Guildford, v. 15, n. 5, p. 335-339, July, 2004.

BLAŽEVIĆ, I.; RADONIĆ, A.; MASTELIĆ, J.; ZEKIĆ, M.; SKOČIBUŠIĆ, M.; MARAVIĆ, A. Glucosinolates, glycosidically bound volatiles and antimicrobial activity of *Aurinia sinuata* (*Brassicaceae*). **Food Chemistry**, Barking, v. 121, n. 4, p. 1020-1028, Aug., 2010.

BONATTO, P.S. Cromatografia gasosa. In: COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATTO, P.S. **Fundamentos de cromatografia.** Campinas: Editora UNICAMP, 2006.p??????

BRAGA, M.R. Fitoalexinas. In PASCHOLATI, S.F., LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular.** Piracicaba: FEALQ, v.13, 2008, cap. 9, p. 305-346.

BUCHOLZ, U.; MASCOLA, L. Transmission, pathogenesis, and epidemiology of *Listeria monocytogenes*. **Infectious Diseases in Clinical Practice**, Philadelphia, v. 10, n. 1, p. 34-41, Jan., 2001.

BUNTHOF, C.J.; VAN DEN BRAAK, S.; BREEUWER, P.; ROMBOUTS, F.M.; ABEE, T. Rapid fluorescence assessment of the viability of stressed *Lactococcus lactis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 65, n.8, p. 3681-3689, Aug., 1999.

CRUZ, C.D.; MARTINEZ, M.B.; DESTRO, M.T. *Listeria monocytogenes*: um agente infeccioso ainda pouco conhecido no Brasil. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 19, n. 2, p. 195-206, Abr./June, 2008.

CUNHA, A.P. da; ROQUE, O.R. Ácidos fenólicos, fenóis e seus derivados. In CUNHA, A.P. da (Coord.). **Farmacognosia e fitoquímica.** 2. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2009. cap. 11 p. 217-224.

DELAQUIS, P.J.; MAZZA, G. Antimicrobial properties of isothiocyanates in food preservation. **Food Technology**, Chicago, v. 49, n.1, p.73–84, 1995.

DELAQUIS, P.J.; SHOLBERG, P.L. Antimicrobial activity of gaseous allyl isothiocyanate. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 60, n. 8, p. 943-947, Aug., 1997.

DIXON, R.A.; PASINETTI, G.M. Flavonoids and isoflavonoids: from plant biology to agriculture and neuroscience. **Plant Physiology**, Rockville, v. 154, n. 2, p. 453-457. Oct., 2010.

DIXON, R.A.; XIE, D.; SHARMA, S.B. Proanthocyanidins - a final frontier in flavonoid research? **Tansley Review. New Phytologist**, London, v. 165, n. 1, p. 9-28, Jan., 2005.

DUARTE, S.; KOO, H.; BOWEN, W.H.; HAYACIBARA, M.F.; CURY, J.A.; IKEGAKI, M.; PARK, Y.K.; ROSALEN, P.L. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of mutans streptococci. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 26, n. 4, p. 527-531, Apr., 2003.

FAHEY, J.W.; ZALCMANN, A.T.; TALALAY, P. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. **Phytochemistry**, Oxford, v. 56, n. 1, p. 5-51, Jan., 2001.

FLEMING, D.W.; COCHI, S.L.; MACDONALD, K.L.; BRONDUN, J.; HAYES. P.S.; PLIKAYTIS, B.D.; HOIMES, M.B.; AUDURIER. A.; BROOME, C.V.; REINGOLD, A. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 312, n. 7, p. 404-407, Jan., 1985.

FONTOURA, R. Estudo iniciado em 1969 traça panorama da listeriose no Brasil. **Notícias do Instituto Oswaldo Cruz**, 20.03.2006. Disponível em: <http://www.ioc.fiocruz.br/pages/informerede/corpo/noticia/2006/marco/20_03_06_01.htm>. Acesso em: 21 Ago. 2009.

GAÑAN, M.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, A. J.; CARRASCOSA, A. V. Antimicrobial activity of phenolic compounds of wine against *Campylobacter jejuni*. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 8, p. 739-742, Aug., 2009.

GATEHOUSE, J.A. Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction. **New Phytologist**, Cambridge, v. 156, n. 2, p. 145-169, Nov., 2002.

GHOSH, D.; SCHEEPENS, A. Vascular action of polyphenols. **Molecular Nutrition and Food Research**, Weinheim, v. 53, n. 3, p. 322-331, Mar., 2009.

GIVAN, A.L. **Flow cytometry:** first principles. 2nd . ed. New York: Wiley-Liss, 2001. 261p.

GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica.** 11. ed. Porto Alegre: AMGH, 2010. 1821p.

GOODMAN, R.N.; KIRALY, Z.; WOOD, K.R. **The biochemistry and physiology of plant disease.** Columbia: University of Missouri Press, 1986. 433p.

GOULET, V.; ROCOURT, J.; REBIERE, I. JACQUET, C.; MOYSE, C.; DEHAUMONT, P.; SALVAT, G.; VEIT, P. Listeriosis outbreak associated with the consumption of rillettes in France in 1993. **The Journal of Infectious Diseases**, Boston, v. 177, n. 1, p. 155-160, Jan., 1998.

GUERRERO, C.C.; BRITO, J.C. Re-use of industrial orange wastes as organic fertilizers. **Bioresource Technology**, Essex, v. 53, n. 1, p. 43-51, Jan., 1995.

GÜLÇIN, I.; HUYUT, Z.; ELMASTAŞ, M.; ABOUL-ENEIN H.Y. Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. **Arabian Journal of Chemistry**, Riyadh, v. 3, n. 1, p. 43-53, Jan., 2010.

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, Oxford, v. 55, n. 6, p. 481-504, Nov., 2000.

HOEFEL, D.; GROOBY, W.L.; MONIS, P.T.; ANDREWS, S.; SAINT, C.P. A comparative study of carboxyfluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester as indicators of bacterial activity. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 52, n. 3, p. 379-388, Mar., 2003.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Levantamento sistemático da produção agrícola.** Rio de Janeiro, v. 23, n. 12, p. 1-80, Dez., 2010.

JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005, 711p.

JAYAPRAKASHA, G.K.; SELVI, T.; SAKARIAH, K.K. Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. **Food Research International**, Essex, v. 36, n. 2, p. 117-122, Jan., 2003.

KAUR, D.; WANI, A.A.; OBEROI, D.P.S.; SOGI, D.S. Effect of extraction conditions on lycopene extractions from tomato processing waste skin using response surface methodology. **Food Chemistry**, Barking, v. 108, n. 2, p. 711-718, May, 2008.

KIM, J.M.; MARSHALL, M.R.; CORNELL, J.A.; PRESTON, J.F; WEI, C.I. Antibacterial activity of carvacrol, citral, and geraniol against *Salmonella typhimurium* in culture medium and on fish cubes. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 60, n. 6, p. 1364-1374, Nov., 1995.

LIN, C.-M.; PRESTON, J.F.; WEI, C.-I. Antibacterial mechanism of allyl isothiocyanate. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 63, n. 6, p. 727-734, June, 2000.

LINK, K.P.; ANGEL, H.R.; WALKER, J.C. The isolation of protocatechuic acid from pigmented onion scales and its significance in relation to disease resistance in onions. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 81, p. 369-375, Feb., 1929.

LLORACH, R.; ESPIN, J. C.; TOMAS-BARBERAN, F. A.; FERRERES, F. Valorization of cauliflower (*Brassica oleraceae L. var. botrytis*) by products as a source of antioxidant phenolics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, n. 8, p. 2181-2187, Mar., 2003.

LO, SZE-CHUNG CLIVE; NICHOLSON, R.L.; TREMACOLDI, C.R. (Trad.). Compostos fenólicos e importância nas doenças em plantas. In PASCHOLATI, S.F., LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. **Interação planta-patógeno:** fisiologia, bioquímica e biologia molecular**.** Piracicaba: FEALQ, v.13, 2008. cap. 8 p. 285-303.

LÓPEZ-MALO VIGIL, A.; PALOU, E.; ALZAMORA, S.M. Naturally occurring compounds - plant sources. In DAVIDSON, P.M.; SOFOS, J.N.; BRANEN, A.L. (Ed.). **Antimicrobials in foods**. 3. ed. Boca Raton: Taylor & Francis, 2005. chap. 14, p. 429-451.

LORBER, B. Listeriosis. In GOLDFINE, H.; SHEN, H. ***Listeria monocytogenes*:** pathogenesis and host response, Springer, 2007. cap. 2, p. 13-31.

LUCIANO, F.B.; HOLLEY, R.A. Enzymatic inhibition by allyl isothiocyanate and factors affecting its antimicrobial action against *Escherichia coli* O157:H7. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 131, n. 2/3, p. 240-245, May, 2009.

LUCIANO, F.B.; HOSSEINIAN, F.S.; BETA, T.; HOLLEY, R.A. Effect of free-SH containing compounds on allyl isothiocyanate antimicrobial activity against *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 73, n. 5, p. M214-M220, June/July, 2008.

LYONS, P.C.; NICHOLSON, R.L. Evidence that cyclic hydroxamate concentration are not related to resistance of corn leaves to anthracnose. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Guelph, v. 11, n. 3, p. 215-20, Sep., 1989.

LYYTIKAINEN, O.; AUTIO, T.; MAIJALA, R.; RUUTU, P.; HONKANEN-BUZALSKI, T.; MIETTINEN, M.; HATAKKA, M.; MIKKOLA, J.; ANTTILA, V. J.; JOHANSSON, T.; RANTALA, L.; AALTO, T.; KORKEALA, H.; SIITONEN, A. An outbreak of *Listeria monocytogenes* serotype 3a infections from butter in Finland. **The Journal of Infectious Diseases**, Boston, v. 181, n. 5, p. 1838-1841, May, 2000.

MACDONALD, P.D.M.; WHITWAM, R.E.; BOGGS, J.D.; MACCORMACK, J.N.; ANDERSON, K.L.; REARDON, J.W.; SAAH, J.R.; GRAVES, L.M.; HUNTER, S.B.; SOBEL, J. Outbreak of listeriosis among Mexican immigrants as a result of consumption of illicitly produced mexican-style cheese. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 40, n. 5, p. 677-682, Mar., 2005.

MELO, P.S. **Composição química e atividade biológica de resíduos agroindustriais.** 2010. 101 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

MIETTINEN, M.K.; SIITONEN, A.; HEISKANEN, P.; HAAJANEN, H.; BJO¨RKROTH, K. J.; KORKEALA, H. J. Molecular epidemiology of an outbreak of febrile gastroenteritis caused by *Listeria monocytogenes* in cold-smoked rainbow trout. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 7, p. 2358-2360, July, 1999.

MISAGHI, I.J. **Physiology and biochemistry of plant** – pathogen interactions. New York: Plenum Press, 1982. 286p.

NAKAMURA, Y.; YOSHIMOTO, M.; MURATA, Y.; SHIMOISHI, Y.; ASAI, Y.; PARK, E.Y.; SATO, K.; NAKAMURA, Y. Papaya seed represents a rich source of biologically active isothiocyanate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, n. 11, p. 4407-4413, May, 2007.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS - NCCLS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. 6th ed. (M7-A6), Wayne, v. 23, n. 2, 2003. 81p.

NIELSEN, P.V.; RIOS, R. Inhibition of fungal growth on bread by volatile components from spices and herbs, and the possible application in active packaging, with special emphasis on mustard essential oil. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 60, n. 2/3, p. 219-229, Sep., 2000.

OSTROSKY, E.A.; MIZUMOTO, M.K.; LIMA, M.E.L.; KANEKO, T.M.; NISHIKAWA, S.O.; FREITAS, B.R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 18, n. 2, p. 301-307, Abr./Jun., 2008.

PALOMINO, J.C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis.* **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, Aug., 2002.

PAPARELLA, A.; TACCOGNA, L.; AGUZZI, I.; CHAVES-LÓPEZ, C.; SERIO, A.; MARSILIO, F.; SUZZI, G. Flow cytometric assessment of the antimicrobial activity of essential oils against *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Guildford, v. 19, n. 12, p. 1174-1182, Dec., 2008.

PIETTA, P.G. Flavonoids as Antioxidants. **Journal of Natural Products**, Pittsburgh, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, July, 2000.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; NOHYNEK, L.; MEIER, C.; KÄHKÖNEN, M.; HEINONEN, M.; HOPIA, A.; OKSMAN-CALDENTEY, K.-M. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 90, n. 4, p. 494-507, Apr., 2001.

RAHMAN, M.; LANE, A.; SWINDELL, A., BARTRAM, S. **Introduction to flow cytometry.** Disponível em: <http://www.abdserotec.com/uploads/Flow-Cytometry.pdf>. Acesso em: 02 Fev. 2011.

RAMOS-NINO, M.E.; RAMIREZ-RODRIGUEZ, C.A.; CLIFFORD, M.N.; ADAMS, M.R. A comparison of quantitative structure-activity relationships for the effect of benzoic and cinnamic acids on *Lisferia monocytogenes* using multiple linear regression, artificial neural network and fuzzy systems. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 82, n. 2, p. 168-176, Feb., 1997.

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. **Farmacognosia e farmacobiotecnologia.** Tradução de I.C. Benedetti, São Paulo: Editorial Premier, 1997. 372p.

ROBBINS, R.J. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, n. 10, p. 2866-2887, Apr., 2003.

ROCHA, J.M.S. Aplicações de agentes tensioactivos em biotecnologia. **Boletim de Biotecnologia,** Lisboa, v. 64, p. 5-11, Dez., 1999.

RODRÍGUEZ VAQUERO, M.J.; ALBERTO, M.R.; NADRA, M.C.M. de. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. **Food Control**, Guildford, v. 18, n. 2, p. 93-101, Feb., 2007a.

RODRÍGUEZ VAQUERO, M.J.; ALBERTO, M.R.; NADRA, M.C.M. de. Influence of phenolic compounds from wines on the growth of *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Guildford, v. 18, n. 5, p. 587–593, May, 2007b.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, New York, v. 30, n. 12, p. 3875-3883, Dec., 1991.

SCHWAN-ESTRADA, K.R.F; STANGARLIN, J.R.; PASCHOLATI, S.F. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In PASCHOLATI, S.F., LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. **Interação planta-patógeno:** fisiologia, bioquímica e biologia molecular**.** Piracicaba: FEALQ, v.13, 2008. cap. 6 p.227-248.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS - SEBRAE. **Brasil é o terceiro maior produtor de frutas do mundo.** Disponível em: <http://www.canalrural.com.br/canalrural/jsp/default.jsp?uf=1&local=1&action=noticias>. Acesso em: 29 Jan. 2011.

SCHUCHAT, A.; SWAMINATHAN, B.; BROOME, C.V. Epidemiology of human listeriosis. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 4, p. 169-183, Apr., 1991.

SHIN, I.S.; MASUDA, H.; NAOHIDE, K. Bactericidal activity of wasabi (*Wasabia japonica*) against *Helicobacter pylori*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, n. 3, p. 255-261, Aug., 2004.

SILVA, T.L. DA; REIS, A.; HEWITT, C.; ROSEIRO, J.C. Citometria de fluxo: funcionalidade celular on-line em bioprocessos. **Boletim de Biotecnologia,** Lisboa, v. 77, p. 32-40, Abr., 2004.

SMITH, M.A.; TAKEUCHI, K.; BRACKETT, R.E.; McCLURE, H.M.;RAYBOURNE, R.B.;WILLIAMS, K.M.;BABU, U.S.;WARE, G.O.; BRODERSON, J.R.;DOYLE, M.P. Nonhuman primate model for *Listeria monocytogenes*-induced stillbirths. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 71, n. 3, p. 1574-1579, Mar., 2003.

SOUSA, C.; TAVEIRA, M.; VALENTÃO, P.; FERNANDES, F.; PEREIRA, J.A.; ESTEVINHO, L.; BENTO, A.; FERRERES, F.; SEABRA, R.M.; ANDRADE, P.B. Inflorescences of *Brassicaceae* species as source of bioactive compounds: a comparative study. **Food Chemistry**, Barking, v. 110, p. 953-961, Oct., 2008.

STALIKAS, C.D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of Separation Science**, Wiley, v. 30, n. 18, p. 3268-3295, Dec., 2007.

TAVARES, W. **Antibióticos e quimioterápicos para o clínico.** 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2009. 599p.

TURGIS, M.; HAN, J.; CAILLET, S.; LACROIX, M. Antimicrobial activity of mustard essential oil against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhi*. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 12, p. 1073-1079, Dec., 2009.

VIG, A.P.; RAMPAL, G.; THIND, T.S.; ARORA, S. Bio-protective effects of glucosinolates - A review. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 42, n. 10, p. 1561-1572, Dec. 2009.

VILELA, N.J.; HENZ, G.P. Situação atual da participação das hortaliças no agronegócio brasileiro e perspectivas futuras. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, Brasília, v. 17, n. 1, p. 71-89, jan./abr., 2000.

WALKER, J.C. Onion Smudge. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v. 20, n. 9, p. 625-721, Feb., 1921.

WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R.L. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 45, n. 2, p. 304-309, Feb., 1997.

WEN, A.; DELAQUIS, P.; STANICH, K.; TOIVONEN, P. Antilisterial activity of selected phenolic acids. **Food Microbiology**, London, v. 20, n. 3, p. 305-311, June, 2003.

WU, L.T.; CHU, C.C.; CHUNG, J.G.; CHEN, C.H.; HSU, L.S.; LIU, J.K.; CHEN, S.C. Effects of tannic acid and its related compounds on food mutagens or hydrogen peroxide-induced DNA strands breaks in human lymphocytes. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 556, n. 1/2, p. 75-82, Nov., 2004.

XIA, D.; Wu, X.; Shi, J.; Yang, Q.; Zhang, Y. Phenolic compounds from the edible seeds extract of Chinese Mei (*Prunus mume Sieb. et Zucc*) and their antimicrobial activity. **LWT- Food Science and Technology**, London, v. 44, n. 1, p. 347-349, Jan., 2011.

YOUSEF, A.E.; COURTNEY, P.D. Basic of stress adaptation and implications in new-generation foods. In YOUSEF, A.E.; JUNEJA, V.K. (Eds.). **Microbial stress adaptation and food safety**, Washington, 2003. cap. 1, p. 2-8.

DOJINDO. Disponível em: http://www.dojindo.com/home/protocol/Bacterial%20cell%20staining.pdf. Acesso em: 01 Maio 2011.