

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**EFICÁCIA DE EXTRATO DE FOLHAS DE *Caryocar brasiliense* Camb. E
Annona crassiflora Mart. NA REDUÇÃO DE *Escherichia coli*
BIOTRANSFERIDA DE FOLHAS DE ALFACE PARA POLIPROPILENO**

LARISSA LORRANE RODRIGUES BORGES



Larissa Lorrane Rodrigues Borges

EFICÁCIA DE EXTRATO DE FOLHAS DE *Caryocar brasiliense* Camb. E *Annona crassiflora* Mart. NA REDUÇÃO DE *Escherichia coli* BIOTRANSFERIDA DE FOLHAS DE ALFACE PARA POLIPROPILENO

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial, para obtenção do título de bacharel em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a Roberta Torres Careli

Montes Claros

2018

Larissa Lorrane Rodrigues Borges. EFICÁCIA DE EXTRATO DE FOLHAS DE *Caryocar brasiliense* Camb. E *Annona crassiflora* Mart. NA REDUÇÃO DE *Escherichia coli* BIOTRANSFERIDA DE FOLHAS DE ALFACE PARA POLIPROPILENO

Aprovado pela banca examinadora constituída por:

Prof. Dr. Eduardo Robson Duarte – ICA/UFMG

MSc. Camila Ribeiro Rocha – UFV



Prof.^a Dr.^a Roberta Torres Careli

Montes Claros, 13 de junho de 2018.

Dedico este trabalho primeiramente a Deus por ser sempre o guia da minha vida e aos meus pais e irmãos, por todo o apoio incondicional durante esta trajetória. Dedico aos “intocáveis” por todo o companheirismo, em especial a Alécia e Klinger que me acompanharam em toda caminhada de trabalho na microbiologia.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela minha vida e pela força e amparo que Ele me concede todos os dias.

A minha família, pelo incentivo, amor, cuidado e por acreditarem e apoiarem meu sonho.

A Professora Orientadora Roberta Torres Careli por seus ensinamentos, paciência e confiança durante a minha graduação.

Ao professor Eduardo Robson Duarte pelos ensinamentos e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos: Alécia, Alisson, Ana Carolina, João Pedro, Klinger, Maria Helena, Raquel e Vinícius, pelo companheirismo e amizade durante todos esses anos de graduação.

A Franciellen Soares e Katchuce Brito pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho.

A Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), em especial ao Instituto de Ciências Agrárias.

A FAPEMIG pela bolsa concedida para realização do projeto de pesquisa.

A todos que contribuíram de alguma forma para minha formação, meu sincero agradecimento.

“Se compreendesses o amor de Deus por ti, deixarias de mendigar qualquer amor”

(Autor desconhecido)

RESUMO

Objetivou-se com este estudo verificar a eficiência sanitizante de extratos etanólicos de folhas de *Caryocar brasiliense* Camb. e *Annona crassiflora* Mart. na redução de células de *Escherichia coli* biotransferidas de folhas de alface para superfícies de polipropileno. Inicialmente, o teste de sensibilidade das cepas de *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 8739 e *E. coli* isolada à antibacterianos convencionais e aos extratos foi realizado pelo método de difusão em ágar e as concentrações inibitórias mínimas (CIM) e as concentrações bactericidas mínimas (CBM) foram determinadas pela técnica de microdiluição seguida de plaqueamento. Posteriormente, o processo de biotransferência e adesão em superfície de polipropileno foram avaliados por 24 h a 7 °C, e a ação sanitizante dos extratos frente as células aderidas nos cupons foi avaliada após o tempo de exposição de 5 minutos. Todas as cepas foram sensíveis aos antibacterianos e observou-se a formação de halo de inibição para os extratos vegetais em estudo frente a todas as cepas testadas. O extrato de *C. brasiliense* apresentou melhor potencial de ação antimicrobiana frente às cepas de *E. coli*, onde o extrato etanólico apresentou CIM de 1,09 mg.mL⁻¹, enquanto que a CIM do extrato de *A. crassiflora* foi de 5,58 mg.mL⁻¹. Não foi encontrada CBM para os extratos vegetais de *C. brasiliense* e *A. crassiflora*. Quando o inóculo nas folhas de alface foi 2 log UFC·mL⁻¹, não houve biotransferência de *E. coli* ao polipropileno, independentemente da cepa avaliada. As maiores contagens de células de *E. coli* biotransferidas e, conseqüentemente, aderidas aos cupons de polipropileno foram observadas quando se inoculou 5 log UFC·mL⁻¹ com contagem média de 4,56 ± 0,16 log UFC.cm⁻². Constatou-se que o tratamento com as soluções dos extratos vegetais de *Annona crassiflora* e *Caryocar brasiliense* reduziu totalmente o número de células de *E. coli* aderidas nos cupons de polipropileno, não sendo verificada diferença entre os extratos para todas as cepas em estudo. Os resultados obtidos com este estudo indicam que a utilização dos extratos etanólicos de *Annona crassiflora* e *Caryocar brasiliense* como antibacterianos é promissora, porém é importante a realização de futuros estudos sobre os mecanismos de ação e toxicidade desses extratos, para aplicação segura e efetiva na sanitização de superfícies utilizadas no processamento de alimentos.

Palavras-chave: Contaminação cruzada. Adesão bacteriana. Sanitização.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Perfis cromatográficos, obtidos por HPLC, características do espectro de UV de flavonoides (picos 1 e 2) e seus respectivos tempo de retenção (TR). A) - extrato etanólico de *Caryocar brasiliense* (TR = 0,972 e 5,878 min) e B) - extrato etanólico de *Annona crassiflora* (TR = 6,484 e 7,704 min)22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média dos halos de inibição (mm) de <i>Escherichia</i> em teste de antibiograma	17
Tabela 2 - Halos de inibição (mm) de <i>Escherichia coli</i> após adição de discos contendo extratos vegetais de <i>Caryocar brasiliense</i> e <i>Annona crassiflora</i> nas concentrações de 136,8 mg.mL ⁻¹ e 139,6 mg.mL ⁻¹ respectivamente	18
Tabela 3 - Número de células (Log UFC/cm ²) das cepas de <i>E. coli</i> , em superfícies de polipropileno após tratamentos com solução de hipoclorito e soluções sanificantes contendo extratos vegetais após o tempo de exposição de 5 minutos à 23 ± 2°C.....	20

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
2.1. Microrganismos	12
2.2. Obtenção dos extratos	13
2.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) dos extratos vegetais	13
2.4. Perfil de sensibilidade antimicrobiana	14
2.5. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	14
2.6. Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM).....	15
2.7. Biotransferência de <i>E. coli</i> para superfícies de polipropileno	15
2.8. Sanitização de cupons de polipropileno	16
2.9. Análise dos resultados	16
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
4. CONCLUSÃO	23
5. REFERÊNCIAS.....	23

1. INTRODUÇÃO

A contaminação das superfícies utilizadas para a manipulação de alimentos é relevante, uma vez que há casos em que a higienização deficiente não remove microrganismos e sujidades, o que favorece a adesão em equipamentos e utensílios. Uma vez que esses microrganismos estejam aderidos ou formem biofilmes, haverá resistência à remoção pelos processos de sanitização (FIGUEIREDO, 2000).

Os materiais das superfícies comumente usados no processamento de alimentos, como aço inoxidável, polipropileno e poliuretano, permitem o crescimento microbiano, que pode originar processos de adesão bacteriana e formação de biofilmes (JUNIOR et al., 2006; LEJEUNE, 2003).

Os biofilmes podem se tornar fortemente aderidos à superfície e, posteriormente, partes desses podem se desprender e contaminar outras superfícies ou produtos alimentícios (JOSEPH et al., 2001). Essa habilidade de transferência independe da quantidade de células e é denominada potencial de biotransferência (COSTA, 1999).

De acordo com Sheikh et al. (2001) amostras de *Escherichia coli* que apresentam padrão de adesão agregativa produzem biofilme regularmente e estão relacionadas com infecções alimentares. Essa espécie é uma enterobactéria Gram-negativa, mesófila, e integra o grupo dos coliformes (EVANGELISTA, 2005).

Segundo Maxcy (1978) patógenos como *Escherichia coli*, possuem condições potenciais para crescer em alface (*Lactuca sativa* L.), que é a hortaliça folhosa mais consumida no mundo (SANTOS et al., 2001). Condições sanitárias desfavoráveis nas áreas rurais e urbanas favorecem essa contaminação, transformando os vegetais em veículos de transmissão de patógenos (RODRIGUES, 2007).

No processamento de alimentos a eliminação de bactérias aderidas e dos biofilmes é um grande desafio, visto que são mais resistentes a agentes antimicrobianos do que células planctônicas (SIMÕES et al., 2006; SIMÕES e VIEIRA, 2009).

Os sanitizantes químicos tradicionais utilizados na indústria de alimentos apresentam como desvantagem o possível desenvolvimento de resistência e adaptação bacteriana, interferindo na eficiência bactericida mínima destes produtos (BERALDO et al., 2013).

O surgimento e a disseminação de microrganismos resistentes aos antimicrobianos disponíveis no mercado têm sido relatados há décadas, incentivando a busca de novas fontes de substâncias com atividades antimicrobianas, como as plantas utilizadas na medicina tradicional (MENDES et al., 2011). O estudo desses agentes é importante, visto que se

buscam, mundialmente, substâncias menos tóxicas e mais eficazes contra a resistência bacteriana e capazes de controlar novos patógenos (BARBOSA-FILHO et al., 2007; OSTROSKY et al., 2008).

Na maioria das vezes, as plantas são usadas na forma de extratos, que são preparações concentradas obtidas a partir do material vegetal que passou por estabilização, secagem e ou moagem, e posteriormente por um solvente extrator (SIMÕES et al., 2003).

O Cerrado é a segunda maior formação vegetal brasileira e um dos mais importantes domínios do país, compreendendo mais de 10 mil espécies vegetais. É considerado assim um celeiro de produtos naturais para a fitoterapia (CHAGAS et al. 2004).

O pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) é uma espécie arbórea nativa do Cerrado Brasileiro pertencente à família Caryocaraceae (OLIVEIRA et al., 2008). O valor terapêutico do pequizeiro atribuído à medicina popular vem sendo pesquisado e há experimentos científicos atestando atividade antifúngica, por inibir o crescimento de *Cryptococcus neoformans* (PASSOS et al., 2002) e também propriedade antimicrobiana por inibir o desenvolvimento de enterobactérias (PAULA-JÚNIOR et al., 2006).

O panã (*Annona crassiflora* Mart.) comum no bioma cerrado, conhecido vulgarmente também como araticum, cabeça-de-negro, cascudo, cortiça, marolo ou pinha-do-cerrado, destaca-se pelo sabor característico dos frutos, sendo utilizado na medicina alternativa por sua ação antifúngica e antibacteriana (ALMEIDA et al., 1998).

Objetivou-se com este estudo verificar a eficiência sanitizante de extratos etanólicos de folhas de *Caryocar brasiliense* Camb.e *Annona crassiflora* Mart. na redução de células de *Escherichia coli* biotransferidas de folhas de alface para superfícies de polipropileno.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microrganismos

Os efeitos antibacterianos dos extratos foram avaliados com as cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 8739 e cepa isolada de esponja de poliuretano utilizada em uma lanchonete, localizada em Montes Claros, MG.

Para identificação da cepa isolada realizou-se análise proteômica seguindo o protocolo de extração padrão adaptado de Freiwald e Sauer (2009). Uma alçada de cultura bacteriana pura foi ressuspensa em 1,2 mL de solução de etanol 75%. A amostra foi centrifugada e o sobrenadante foi removido. Foi adicionado 50 µL de acetronitrila, ácido fórmico e água (50:35:15 v/v) ao *pellet* formado, o qual sofreu agitação em vortéx durante 1 min para

extração de células. Foi realizada uma segunda centrifugação e 0,3 µL de sobrenadante foi depositado em uma placa com três poços e este foi seco em temperatura ambiente. Adicionou-se 0,3 µL de uma solução saturada de alpha-ciano-4-ácido-hidroxicianídrico, acetonitrila, água e TFA (50:47:5:2,5 v/v).

A análise por *Matrix-assisted laser desorption/ionization - time of flight - mass spectroscopy* (MALDI-TOF MS) foi realizada segundo Dusková et al. (2012), utilizando Microflex™ MALDI-TOF MS (BrukerDaltonics, Billerica, Massachusetts, EUA). As identificações foram expressas por BioTyper log (*scores*), indicando a similaridade da cepa desconhecida por MALDI TOF MS com o perfil disponível em bancos de dados.

2.2. Obtenção dos extratos

Folhas de *C. brasiliense* Camb. e *A. crassiflora* Mart., com números de depósito, respectivamente, 338 e 1492 no herbário da Universidade Estadual de Montes Claros, foram coletadas no Instituto de Ciências Agrárias da UFMG em Montes Claros, Minas Gerais. Essa região localiza-se aproximadamente a 16°51' de latitude e 44°55' de longitude, o clima da região, tropical úmido com verão seco de acordo com a classificação de Köppen (ALVARES et al. 2014), é marcada por uma longa estação seca de maio a setembro e um período chuvoso em janeiro e fevereiro.

As folhas foram secas em estufa de circulação de ar forçado a 38 °C por aproximadamente 72 h, sendo então trituradas em liquidificador industrial e armazenadas em recipiente opaco. Os extratos etanólicos foram obtidos pela adição de 100g do material vegetal em 1000 mL de etanol PA. Essa mistura foi armazenada em frasco âmbar por dez dias e acondicionada em local seco e isento de iluminação a temperatura ambiente. Filtrou-se o extrato em funil com gaze e algodão, sendo levado em seguida para estufa com ventilação forçada a 40 °C por aproximadamente três dias (MELLO, 2002).

Os extratos de folhas de *C. brasiliense* Camb. e *A. crassiflora* Mart. foram filtrados em membrana milipore de celulose com 0,2 µm e, posteriormente, alíquotas das soluções obtidas foram submetidas à determinação de matéria seca, para cálculo das concentrações a serem testadas (CUNNIF, 1995).

2.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) dos extratos vegetais

A análise cromatográfica dos extratos vegetais de *C. brasiliense* e *A. crassiflora* foi realizada por HPLC (High Performance Liquid chromatography) em equipamento Merck-Hitachi (Alemanha) composto de bomba L-6200A, injetor automático AS-2000A, detector

UV-VIS L-4250 e integrador D-2500. Utilizou-se uma coluna de ODS (250x4,0 mmd.i.,5 mm, Merck, Alemanha) fluxo de 1,0 mL/min, temperatura de 40 °C, procedendo-se a eluição com gradiente linear de H₂O (A) e CH₃CN (B): 0 min 90 % A, 10 % B; 60 min 10 % A, 90 % B, seguido de 5 min de eluição isocrática. A detecção foi realizada no UV a 261,5 nm. Foram utilizados solvente grau HPLC (Merck, Alemanha) e a remoção do ar foi realizada por sonicação. Para as análises da separação dos compostos químicos, as amostras foram dissolvidas em metanol grau HPLC, para concentrações de 10 mg/mL e 5 mg/mL, respectivamente, para extratos e frações, sendo as soluções centrifugadas a 10.000 rpm, durante 10 min, previamente à injeção. Alíquotas destas soluções (5 mL) foram injetadas de modo automático.

2.4. Perfil de sensibilidade antimicrobiana

O teste de sensibilidade a antimicrobianos (TSA) foi realizado de acordo com o NCCLS (2005) e conduzido em triplicata. Colônias das bactérias crescidas em placas contendo Ágar padrão para contagem de micro-organismos (PCA) (HIMEDIA®^{Mumbai, Índia.}) foram suspensas em solução salina estéril (NaCl 0,85% m/v) até se obter uma turvação compatível com o grau 0,5 da escala Mac Farland. Em placas de Ágar Mueller-Hinton (HIMEDIA®^{Mumbai, Índia.}) inoculou-se 200 µL da suspensão que foram espalhados com o auxílio de *swabs* estéreis. Sobre a superfície desse meio adicionou-se discos de antimicrobianos: cloranfenicol 30 µg, gentamicina 10 µg, ciprofloxacina 5 µg, sulfazotrim 25 µg e norfloxacina 10 µg para *Escherichia* spp., segundo descrito no NCCLS (2005). As placas foram incubadas em estufa BOD a 35°C por 24 horas e os diâmetros dos halos de inibição mensurados em milímetros (mm), para que as bactérias fossem classificadas como resistentes ou sensíveis. Além disso, foram testados juntamente com os discos de antimicrobianos, discos dos extratos das folhas das plantas avaliadas, para se fazer uma comparação das medidas dos halos de inibição. Para isso, discos de papel filtro com 5 mm de diâmetro foram autoclavados e impregnados com 20 µL dos extratos nas concentrações de 136,8 mg.mL⁻¹ para o extrato de *C. brasiliense* Camb. e 139,6 mg.mL⁻¹ para o extrato de *A. crassiflora* Mart.

2.5. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos frente às cepas em estudo foi realizada em triplicata utilizando método de microdiluição (CLSI, 2011). Para o preparo do inóculo realizou-se o cultivo das bactérias em placas contendo Agar Mueller Hinton (HIMEDIA®^{Mumbai, Índia.}), as quais foram incubadas por 24 h a 37 °C. Para o ajuste do

inóculo segundo o padrão de Mac Farland de $0,5 (10^6 \text{ UFC.mL}^{-1})$, adicionou-se em tubo de ensaio contendo 5,0 mL de NaCl estéril 0,85% (m/v) uma alçada do microrganismo e em seguida agitou-se em vortéx durante 1 min.

Em placa de microdiluição de 96 poços, foram adicionados 80 μL de Caldo Mueller Hinton (HIMEDIA®^{Mumbai, Índia.}) em cada poço. Em seguida foram acrescentados 20 μL dos extratos e realizada a diluição seriada, obtendo-se as concentrações de 27,36 a $0,22 \text{ mg.mL}^{-1}$ para o extrato de *C. brasiliense* Camb. e 27,92 a $0,22 \text{ mg.mL}^{-1}$ para o extrato de *A. crassiflora* Mart. Adicionou-se ainda 100 μL das suspensões bacterianas (10^6 UFC.mL^{-1}). Para o controle do crescimento, 100 μL das suspensões bacterianas foram adicionados a 80 μL do caldo Müeller-Hinton (HIMEDIA®^{Mumbai, Índia.}). As placas foram incubadas a 37°C durante 18 h, com posterior adição de 100 μL de tetrafeniltetrazóico (TTC) 1%, para observação de crescimento microbiano que é indicado por coloração avermelhada.

2.6. Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A partir dos poços nos quais não houve crescimento bacteriano visível, após a adição de tetrafeniltetrazóico no teste da CIM, uma alçada das amostras que não apresentaram coloração vermelha, foi transferida para placas contendo Ágar MacConkey (HIMEDIA®^{Mumbai, Índia.}), as quais foram incubadas a 35°C por 24 h para observação do crescimento microbiano (NCCLS, 2005).

2.7. Biotransferência de *E. coli* para superfícies de polipropileno

Inicialmente foi realizado um teste de exclusão microbiológica nas amostras de alface crespa (*Lactuca sativa* L.), variedade Vitória de Santo Antão, obtidas comercialmente em Montes Claros, MG e armazenadas a $7^\circ \text{C} \pm 2^\circ \text{C}$, até o momento das análises. Para verificar a ausência de contaminação por *E. coli*, foi utilizado o método de número mais provável (NMP) (KORNACKI e JOHNSON, 2001).

Anteriormente ao estudo da biotransferência realizou-se a higienização das folhas de alface conforme procedimentos descritos por Lima (2008). Sendo as folhas externas das amostras de alface removidas e descartadas e as folhas íntegras lavadas em água corrente. Para a sanitização, as folhas foram imersas em solução de dicloroisocianurato de sódio (Nippoclor®) com 200 mg.L^{-1} de cloro total em pH 6,1 por 15 min. A solução clorada foi neutralizada por enxágüe em uma solução esterilizada de tiosulfato de sódio 0,5 % (m/v) por 5 min. Em seguida as folhas foram retiradas asépticamente da solução e imersas em água

destilada esterilizada por 20 min para drenagem. Sob condições assépticas, as folhas de alface foram cortadas em cupons de dimensões de 2 x 2 cm.

Cupons de polipropileno (2,0 cm x 2,0 cm x 0,2 cm) foram higienizados a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ com água potável e detergente neutro. Posteriormente, foram enxaguados com água destilada e sanitizados com álcool etílico 70 % (v/v). Os cupons foram secos em estufa a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 h e esterilizados a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 min (ROSSONI e GAYLARDE, 2000).

Para a avaliação do potencial de biotransferência, cupons de alface contaminados com inóculo de $10^2\text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $10^5\text{ UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cada cepa foram colocados em contato com cupons de polipropileno por 24 h a $7\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, a quantidade de células transferidas foi quantificada em Agar MacConkey (HIMEDIA®, Mumbai, Índia.) e os resultados expressos em $\text{UFC}\cdot\text{cm}^{-2}$, segundo Careli et al. (2009).

2.8. Sanitização de cupons de polipropileno

Decorrido o período de biotransferência e adesão bacteriana de 24 h, os cupons com aderidas ao polipropileno, foram submetidos aos seguintes tratamentos: imersão em soluções de extratos nas concentrações inibitórias mínimas (CIM); solução controle de água destilada esterilizada e solução de hipoclorito de sódio a $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (v/v) para comparação com um produto sanitizante comercial. Para isso com o auxílio de pinça esterilizada, os cupons foram imersos separadamente em NaCl 0,85 % (m/v) para a remoção de células planctônicas e em seguida, foram imersos nos tratamentos e a ação sanitizante das soluções foi avaliada após 5 min de contato sob condições estáticas a temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Os cupons referentes a cada tratamento foram transferidos para 10 mL de solução salina 0,85 % (m/v) e sonicados por 2 min usando banho de ultrassom, com 40 kHz, para a remoção de células aderidas sobreviventes nas superfícies dos cupons (MALHEIROS et al., 2012, com modificações). Foram realizadas diluições decimais seriadas sucessivas, com inoculação em placas contendo Ágar Mac Conkey (HIMEDIA®, Mumbai, Índia.) e incubação de $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h. Após essas condições de crescimento, quantificou-se as unidades formadoras de colônia (UFC) e os resultados foram expressos em $\text{UFC}\cdot\text{cm}^{-2}$, segundo Careli et al. (2009).

2.9. Análise dos resultados

Os procedimentos foram realizados em três repetições e os resultados convertidos em escala logarítmica para atender a pressuposição de normalidade. Realizou-se análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, considerando a significância de 5% no programa estatístico SISVAR (2011).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Identificação do isolado

A cepa isolada em estudo foi identificada por análise proteômica como *Escherichia coli* com 99,9% de similaridade com o perfil disponível no banco de dados.

Sensibilidade das cepas a antibacterianos

As cepas de *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 8739 e isolada foram sensíveis a todos os antibacterianos testados, cujos halos de inibição foram descritos na Tabela 1. Ribeiro et al. (2018) ao avaliarem a sensibilidade antimicrobiana de *E. coli* ATCC 25922 também constataram sensibilidade bacteriana a clorafenicol, ciprofloxacina e norfloxacina, porém obtiveram sensibilidade intermediária da cepa para o antibiótico gentamicina.

Tabela 1 - Média dos halos de inibição (mm) de *Escherichia* em teste de antibiograma

Antibióticos	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>E. coli</i> ATCC 8739	<i>E. coli</i> isolada
Clorafenicol 30 µg	27 ± 1,0	30 ± 0,0	25 ± 0,0
Gentamicina 10 µg	20 ± 0,0	28,5 ± 1,5	22 ± 0,0
Ciprofloxacina 5 µg	36,5 ± 0,5	40 ± 0,0	32,5 ± 2,5
Sulfazotrim 25 µg	24,5 ± 0,5	36 ± 1,0	24 ± 1,0
Norfloxacina 10 µg	36,5 ± 0,5	36,5 ± 0,5	32,5 ± 2,5

Em relação aos extratos obtidos das folhas de *C. brasiliense* e *A. crassiflora*, foi detectada a formação de halo de inibição para as duas espécies vegetais em estudo frente a todas as cepas testadas (Tabela 2). Não foram constatadas diferenças significativas para a ação do extrato de *C. brasiliense* entre as cepas em estudo. Entretanto, para o extrato de *A. crassiflora* observou-se menor efeito antibacteriano ($p < 0,05$) frente a *E. coli* ATCC 25922 (Tabela 2).

Tabela 2 - Halos de inibição (mm) de *Escherichia coli* após adição de discos contendo extratos vegetais de *Caryocar brasiliense* e *Annona crassiflora* nas concentrações de 136,8 mg.mL⁻¹ e 139,6 mg.mL⁻¹ respectivamente

Extrato	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>E. coli</i> ATCC 8739	<i>E. coli</i> isolada
<i>Caryocar brasiliense</i>	10 ^A ± 0,0	8,5 ^A ± 0,5	8,0 ^A ± 1,0
<i>Annona crassiflora</i>	7,0 ^B ± 0,0	9,5 ^A ± 0,5	10 ^A ± 0,0

Médias seguidas por letras diferentes nas linhas diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Efeito inibitório de extrato de folhas de *Caryocar brasiliense* e *Annona crassiflora* foi obtido em outros estudos. Para o extrato de *C. brasiliense* em concentrações de 1,5 e 2 mg.mL⁻¹, inferiores a deste trabalho, obteve-se halos médios de 7 e 8 mm respectivamente para cepa de *E. coli* ATCC 25922 (PAULA-JÚNIOR et al., 2006). Para extratos de folhas de *C. brasiliense* e *A. crassiflora* na concentração de 84 mg.mL⁻¹, foram encontrados halos de inibição superiores aos deste estudo, com valores de 11,3 mm e 10,1 mm (RIBEIRO et al. 2018).

Entretanto, em estudo com extrato da casca de *C. brasiliense* sobre *E. coli* ATCC 25753 nas concentrações de 200 a 500 mg.mL⁻¹ não obteve-se formação de halo de inibição. O menor efeito ou ausência de atividade antibacteriana dos extratos pode ser decorrente da concentração do extrato, qualidade das folhas ou cascas que pode ser alterada por condições de solo, sazonalidade, tipo de colheita e teor de ativos ou mesmo da menor sensibilidade dos microrganismos estudados (PINHO et al., 2012).

Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

O extrato de *C. brasiliense* apresentou melhor potencial de ação antimicrobiana frente às cepas de *E. coli* em estudo, apresentando CIM de 1,09 mg.mL⁻¹, enquanto que a CIM do extrato de *A. crassiflora* foi de 5,58 mg.mL⁻¹. Apesar de ambas as espécies vegetais apresentarem ação bacteriostática, não foi detectada ação bactericida para nenhum dos extratos nas concentrações avaliadas neste estudo.

A ação bacteriostática de extratos dessas espécies vegetais foi relatada em outros estudos frente a *E. coli* ATCC 25922. Para o extrato etanólico de *C. brasiliense*, encontrou-se os valores de 25 mg.mL⁻¹ e 0,27 mg.mL⁻¹ e para o extrato de *A. crassiflora* 6,24 mg.mL⁻¹

(PINHO et al., 2012; RIBEIRO et al., 2018). Apesar da ausência de ação bactericida desses extratos neste estudo, essa já foi relatada com resultado de 30 mg.mL⁻¹ para o extrato etanólico de *C. brasiliense* e 6,24 mg mL⁻¹ para *A. crassiflora* (RIBEIRO et al., 2018).

Biotransferência das células bacterianas à superfície de polipropileno

Observou-se que a concentração do inóculo inicial contribuiu para diferença ($p < 0,05$) do número de células transferidas dos cupons de alface para a superfície de polipropileno. Dessa forma, quando o inóculo foi 2 log UFC·mL⁻¹, não houve biotransferência ($p > 0,05$) de *E. coli* ao polipropileno, independentemente da cepa avaliada. A Resolução da diretoria colegiada (RDC) n° 12 de 2 de janeiro de 2001 da ANVISA estabelece que amostras de hortaliças frescas "in natura" devem apresentar contagem máxima de coliformes a 45 °C de 2 log NMP/g. (BRASIL, 2001). A ausência de biotransferência nesta situação indica que se a contagem de *E. coli* nas folhas de alface for mantida dentro dos padrões preconizados pela legislação vigente, não se teria a ocorrência de contaminação da superfície de corte de vegetais nas condições estudadas.

Outros estudos relataram a contaminação de alface por Coliformes a 45°C em contagens superiores à estabelecida pela legislação. Como o estudo de Paula et al. (2009) que registraram contagem de 4,70 log NMP.g⁻¹ e Souto (2005) que obteve contagem média de 5,96 log NMP g⁻¹ em alface crespa.

As maiores contagens de células de *E. coli* biotransferidas e, conseqüentemente, aderidas aos cupons de polipropileno foram observadas quando se inoculou 5 log UFC·mL⁻¹, com contagem média de 4,56 ± 0,16 log UFC.cm⁻². Segundo Andrade et al. (1998), para se considerar um biofilme, é necessário um número mínimo de 7 log UFC·cm² de superfície. Dessa forma, constatou-se que as estirpes não foram capazes de formar biofilmes.

As superfícies de polipropileno geralmente são utilizadas para corte e a manipulação de folhas de alface contaminadas poderia favorecer a ocorrência de contaminação cruzada pela transferência de microrganismos patogênicos das superfícies de manipulação para os alimentos. Embora não houve formação de biofilmes pelas estirpes de *E. coli* não se pode menosprezar o processo de adesão ocorrido, devido ao fato de bactérias aderidas serem mais resistentes aos sanificantes do que as em suspensão (PENG et al., 2001).

As superfícies comumente usadas para processamento de alimentos permitem o crescimento microbiano, podendo originar processos de adesão bacteriana como observado neste estudo e formação de biofilmes. A presença desses processos nas superfícies de

equipamentos e utensílios para processamento de alimentos ocorre em diferentes níveis de intensidade, sendo que a liberação desses microrganismos pode reduzir a qualidade do alimento produzido e ocasionar deterioração e veiculação de patógenos (ANDRADE, 2008)

Os resultados obtidos neste trabalho corroboram com os descritos por Rocha et al. (2014) que avaliaram a adesão de *E. coli* ATCC 8739 por 12 h em superfície de polipropileno utilizada para corte de alimentos. Esses autores não observaram a formação de biofilme pela cepa avaliada, somente o processo de adesão com contagens médias de 5 log UFC.cm⁻².

Capacidade sanitizante dos extratos vegetais avaliada

Constatou-se que o tratamento com as soluções dos extratos vegetais de *Annona crassiflora* e *Caryocar brasiliense* apresentou eficácia de 100% na redução de células de *E. coli* aderidas nos cupons de polipropileno, não sendo verificada diferença ($p > 0,05$) entre os extratos para todas as cepas em estudo (Tabela 3).

Observou-se ainda que não houve diferenças ($p > 0,05$) entre o tratamento dos cupons de polipropileno com os extratos vegetais em comparação com o tratamento convencional com solução de hipoclorito de sódio 200 mg.L⁻¹ (v/v) (Tabela 3). Dessa forma, o tempo de 5 minutos de contato com as soluções sanitizantes nas concentrações avaliadas foi suficiente para a remoção total das células aderidas das cepas de *E. coli* sobre os cupons de polipropileno.

Tabela 3 - Número de células (Log UFC.cm⁻²) das cepas de *E. coli*, em superfícies de polipropileno após tratamentos com solução de hipoclorito e soluções sanificantes contendo extratos vegetais após o tempo de exposição de 5 min à 23 ± 2°C.

Tratamentos	Estirpes		
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>E. coli</i> ATCC 8739	<i>E. coli</i> isolada
Controle	3,77 ^A	4,82 ^A	4,99 ^A
Hipoclorito 200 ppm	0,00 ^B	0,00 ^B	0,00 ^B
<i>Caryocar brasiliense</i> (1,09 mg.mL ⁻¹)	0,00 ^B	0,00 ^B	0,00 ^B
<i>Annona crassiflora</i> (5,58 mg.mL ⁻¹)	0,00 ^B	0,00 ^B	0,00 ^B
CV (%)	5,63	5,16	8,42

Médias seguidas por letras iguais, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste Tukey ($p > 0,05$). (CV) coeficiente de variação.

Ainda não foi relatada a utilização dos extratos de *Annona crassiflora* e *Caryocar brasiliense* na sanitização de superfícies utilizadas no processamento de alimentos. Porém, com este trabalho foi possível observar a redução média de $4,56 \pm 0,16$ ciclos logarítmicos nas contagens de células sésseis de *Escherichia coli* nos cupons de polipropileno.

Diante da importância que a higienização desempenha na obtenção de alimentos seguros e de qualidade, além da adoção de práticas corretas para execução da mesma. Novos procedimentos ou produtos nesta área vêm sendo pesquisados com intuito de tornar mais eficiente a remoção de resíduos de alimentos e a eliminação de microrganismos de superfícies industriais, evitando a formação de biofilmes microbianos (BATISTA et al., 2014).

Cromatografia dos extratos

Os valores do espectro de UV observados indicaram a presença de flavonóides nos extratos etanólicos de *Annona crassiflora* e *Caryocar brasiliense* (Figura 1). A intensidade máxima de absorvância do extrato de *C. brasiliense* foi observada na região entre 278,1-273,3 nm, e do extrato de *A. crassiflora* na região entre 279,3-278,1 nm, em seus respectivos tempos de retenção.

Os flavonóides são classificados em 10 classes de compostos: antocianinas, leucoantocianidinas, flavonóis, flavonas, glicoflavonas, biflavonilas, chalconas, auronas, flavanonas e isoflavonas. Possuem propriedades químicas dos fenóis, sendo relativamente solúveis em água, principalmente quando possuem moléculas de açúcares ligadas à estrutura (YAO, et al. 2004; HARBONE, 1984).

Segundo Yao, et al. (2004) e Markham (1982) os flavonóides são compostos levemente ácidos e polares ou moderadamente polares, sendo solúveis em etanol, metanol e butanol e combinações de solventes com água. Esses compostos apresentam intensa absorção no UV, exibindo duas bandas: banda I (320-385 nm) e banda II (250-285 nm).

O efeito antimicrobiano apresentado pelos extratos de *A. crassiflora* e *C. brasiliense* poderia ser atribuído aos componentes detectados no perfil cromatográfico das espécies vegetais, sendo o perfil compatível com flavonóides, devido à intensidade máxima de absorvância dos extratos se apresentarem dentro do espectro de absorção no UV dos flavonóides.

Para a espécie *A. crassiflora* já foi detectada a presença de compostos fenólicos, flavonóides glicosilados e taninos condensados (LAGE, 2011; ROESLER et al., 2007). Na espécie *C. brasiliense* foram realizados testes fitoquímicos que identificaram taninos

condensados, taninos hidrolisados, flavonoides e saponinas (PAULA-JÚNIOR *et al.* 2006; MOURA *et al.* 2013; LOPES *et al.* 2011). Esses compostos apresentam importantes atividades biológicas, tais como: pesticida, vermífida e antimicrobiana (SANTOS, 2007; LAGE, 2011; PAULA-JÚNIOR *et al.* 2006).

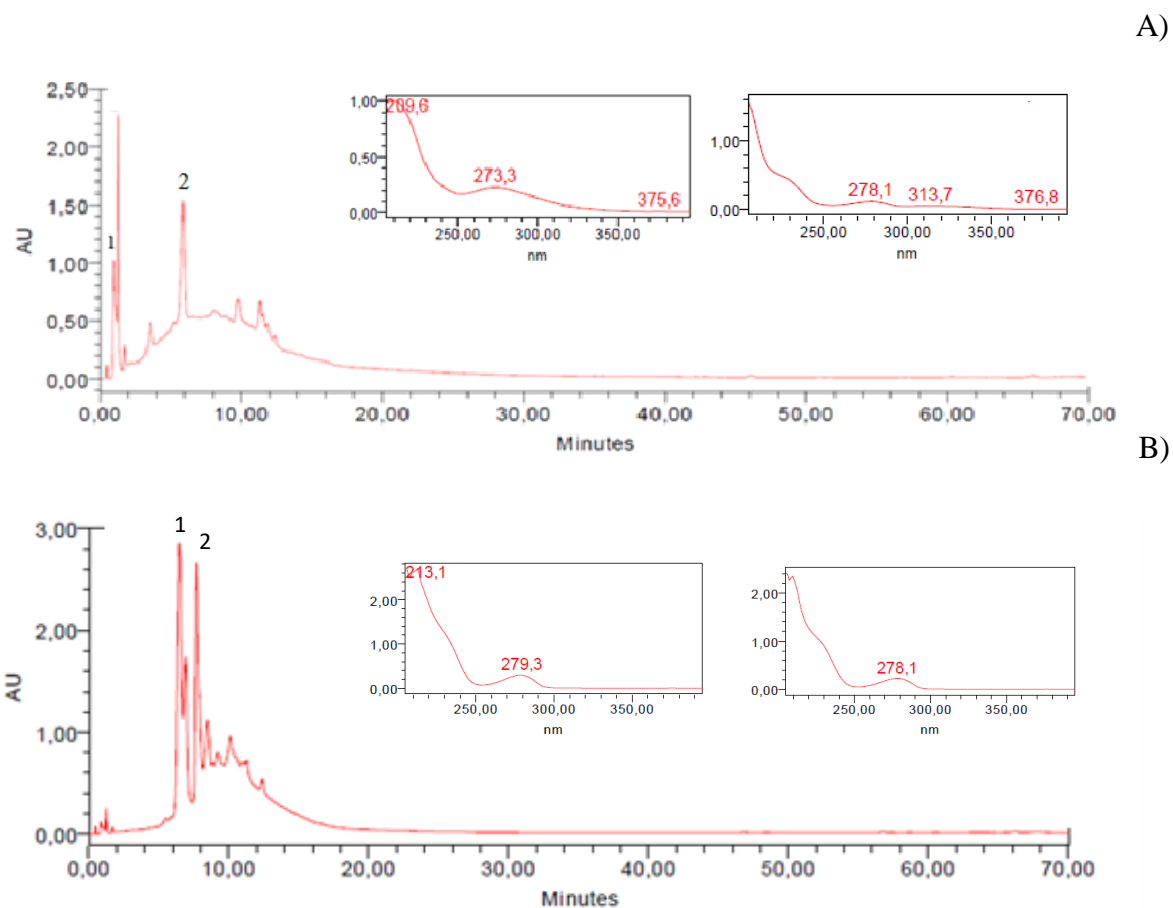


FIGURA 1: Perfis cromatográficos, obtidos por HPLC, características do espectro de UV de flavonoides (picos 1 e 2) e seus respectivos tempo de retenção (TR). A) - extrato etanólico de *Caryocar brasiliense* (TR = 0,972 e 5,878 min) e B) - extrato etanólico de *Annona crassiflora* (TR = 6,484 e 7,704 min).

A atividade antimicrobiana dos extratos vegetais tem sido atribuída principalmente aos taninos, que segundo Cushnie and Lamb (2005) são compostos inseridos no grupo dos flavonóides. Nos estudos realizados por Djipa *et al.* (2000) e Ribeiro (2018), esses autores relataram que a retirada de taninos suprimiu a atividade antimicrobiana de extratos frente as bactérias em estudo.

Ribeiro (2018) relatou que os extratos com a presença de taninos, foram mais eficientes, indicando que esse metabólito, de forma isolada ou juntamente em associação com outros compostos vegetais seria o principal componente com ação antibacteriana para os extratos de *Caryocar brasiliense* e *Schinopsis brasiliensis*.

Os taninos são definidos como compostos fenólicos, que são altamente reativos quimicamente e formam pontes de hidrogênio, intra e intermoleculares (MONTEIRO et al. 2005). Estudos sobre atividade dos taninos evidenciaram importante ação antibacteriana, sendo esses já identificados como princípios ativos de vários extratos vegetais pesquisados pela farmacognosia mundial (CASTEJON, 2011).

De acordo com Mello & Santos (2001) as atividades bactericidas e fungicidas dos taninos ocorrem pela complexação com íons metálicos; atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres; habilidade de complexar com outras moléculas, principalmente proteínas e polissacarídeos.

O efeito antibacteriano dos taninos segundo Scalbert (1991) deve-se a atuação dos taninos inibindo enzimas bacterianas e fúngicas e/ou se complexando com os substratos dessas enzimas; ação dos taninos sobre as membranas celulares dos microrganismos, modificando seu metabolismo, e complexação dos taninos com íons metálicos, diminuindo a disponibilidade de íons essenciais para o metabolismo microbiano.

4. CONCLUSÃO

As cepas de *E. coli* foram sensíveis aos extratos etanólicos de *Annona crassiflora* e *Caryocar brasiliense*, apresentando halos de inibição e CIM para todas as cepas. Observou-se a capacidade de biotransferência seguida de adesão das cepas de *E. coli* na superfície dos cupons de polipropileno, sendo que as soluções sanitizantes formuladas com os extratos vegetais de *Annona crassiflora* e *Caryocar brasiliense* foram eficientes na redução das células presentes nas superfícies dos cupons de polipropileno. Os resultados obtidos com este estudo indicam que a utilização dos extratos vegetais de *Annona crassiflora* e *Caryocar brasiliense* como antibacterianos é promissora, porém é importante a realização de futuros estudos sobre os mecanismos de ação e toxicidade desses extratos, para aplicação segura e efetiva na sanitização de superfícies utilizadas no processamento de alimentos.

5. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: Embrapa/CPAC, 1998.

ALVARES, C.A., STAPE, J.L., SENTELHAS, P.C., GONÇALVES, J.L.M. and SPAROVEK, G. Köppen's climate classification map for Brazil. **Metereologische Zeitschrift**, v. 22, p. 711-728, 2014.

AMARAL, L. F. B., MORIEL, P., FOGGIO, M. A.; MAZZOLA, P. G. *Caryocar brasiliense* supercritical CO₂ extract possesses antimicrobial and antioxidant properties useful for

personal care products. **Journal of the International Society for Complementary Medicine Research**, v. 73, 2014.

ANDRADE, N. J. **Higiene na indústria de alimentos: Avaliação e Controle da Adesão e Formação de Biofilmes Bacterianos**. São Paulo: Varela, 2008. 412 p.

ANDRADE, N. J.; BRIDGMAN, T. A.; ZOTTOLA, E. A. Bacteriocidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 7, p. 833-8, 1998.

BARBOSA-FILHO, J. M. et al. Natural products with antileprotic activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, p.141-148, 2007.

BATISTA, N. N. Formação de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa* sobre aço inoxidável em contato com leite e seu controle por óleos essenciais. **Brazilian Journal Food Nutrition**, v. 25, n.1, p. 19-24, 2014.

BERALDO, C. et al. Eficiência de óleos essenciais de canela e cravo-da-índia como sanitizantes na indústria de alimentos. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 43, n. 4, p. 436- 440, out./dez. 2013.

BRASIL - Ministério da Saúde. Resolução n 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder executivo, Brasília, DF, Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 30 ago. 2017.

CARELI, R. T. et al. The adherence of *Pseudomonas fluorescens* to marble, granite, synthetic polymers, and stainless steel. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, p. 171-176, 2009.

CASTEJON, F. V. O. **Taninos e saponinas**. 2011. 29 f. Dissertação (Pós graduação em Ciência Animal) - Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011.

CHAGAS, A.C.S. (2004) Controle de parasitas utilizando extratos vegetais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, p. 156-160, 2004.

CLSI, 2011. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement. CLSI document M100-S21. Clinical and Laboratory, Standards Institute, Wayne, PA.

COSTA, E. T. R. **Desenvolvimento de metodologia para detecção da adesão microbiana em superfície de aço inoxidável**. 1999. 81p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Veterinária) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

CUNNIF, P. **Official methods of AOAC International**. AOAC International, ed. 16, v. 1, 1995.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, p. 343-356, 2005.

DJIPA, C. D. et al. Antimicrobial activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (L) Alston (Myrtaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.71, n.1-2, p.307-313, 2000.

DUSKOVÁ, M.; SEDO, O.; KSICOVÁ, K.; ZDRAHÁL, Z.; KARPÍSKOVÁ, R. Identification of lactobacilli isolated from food by genotypic methods and MALDI-TOF MS. **International Journal of Food Microbiology**, v. 159, p. 107–114, 2012.

EVANGELISTA, J. **Alimentos**: um estudo abrangente. 1 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia** (UFLA), v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

FIGUEIREDO, H. M. **Adesão bacteriana em modelo de circuito de processamento de leite**. 2000. 85 f. Tese (Programa de Pós graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2000. Disponível em: < <http://www.locus.ufv.br/bitstream/handle/123456789/10874/texto%20completo.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 26 mai. 2018.

FREIWALD, A.; SAUER, S. Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. **Nature Protocols**, v. 4, p. 732-742, 2009.

HARBONE, J. B. **Phytochemical methods**: a guide to modern techniques of plant analysis. 2.ed. London: Chapman and Hall, 1984. 288p.

JOSEPH B., OTTA S. K., KARUNASAGAR I. Biofilm formation by Salmonella spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, n.3, p. 367-72, 2001.

JUNIOR, A. R., et al. **Tecnologia do PVC**. 2 ed. São Paulo: Proeditores/Braskem, 2002. Disponível em:< http://www.jovemparceiro.com.br/Portal/Principal/Arquivos/Download/Upload/Tecnologia%20do%20PVC%20a%20edi%C3%A7%C3%A3o_22.pdf >. Acesso em: 20 dez. 2016.

KORNACKI, J. L.; JOHNSON, J. L. *Enterobacteriaceae*, coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. (ed.). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4 ed. Washington: APHA, 2001. Cap.8, p.69-82.

LAGE, G. A. **Isolamento, identificação química e bioprospecção de metabólitos secundários nas folhas de Annona crassiflora Mart.**. 2011. 53 f. Dissertação (Mestre em Química – Química Orgânica), Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

LEJEUNE, P. Contamination of abiotic surfaces: what a colonizing bacterium sees and how to blur it. **Trends in Microbiology**, London, v. 11, p. 179-184, 2003.

LIMA, P. M. **Influência da microbiota natural e de fatores físico químicos na adesão de Salmonella Enteritidis em alface de cultivo hidropônico e convencional**. Viçosa, MG: 56 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 2008.

LOPES, T. C. et al. Avaliação moluscicida e perfil fitoquímico das folhas de *Caryocar Brasiliense camb.* **Cad. Pesq.**, São Luís, v. 18, n. 3, set./dez. 2011.

MALHEIROS, P. S. et al. Evaluation of growth and transfer of *Staphylococcus aureus* from poultry meat to surfaces of stainless steel and polyethylene and their disinfection. **Food Control**, v. 21, p. 298-301, 2010.

MARKHAM, K. R. **Techniques of flavonoid identification**. New York: Academic Press, 1982. 113p.

MAXCY, J. Lettuce salad as a carrier microorganisms of public significance. **J. Food Protection**, v. 41, n. 6, p.435- 438, 1978.

MENDES, L. P. M. et al. Atividade Antimicrobiana de Extratos Etanólicos de *Peperomia pellucida* e *Portulaca pilosa*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicadas**, v. 32, n. 1, p. 121-125, 2011.

MONTEIRO, J. M.; ALBURQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

MOURA, L. R. et al. Extrato hidroalcoólico da casca do pequi (*Caryocar brasiliense*) em ratos submetidos à aplicação de doxorrubicina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.43, n.1, p.100-106, jan, 2013.

NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement**. [Online]. CLSI/NCCLS document M100-S15 [ISBN 1-56238-556-9]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA. (2005) Disponível em:< http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi_OPASM100S15.pdf> Acesso em: 10 ago. 2017.

Mello CP, Santos SC. Taninos 4 ed In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora Universitária/UFRGS/Ed da UFSC; 2002.

NITSCHKE, M. Biotensoativos como agentes inibidores da adesão de patógenos em superfícies de materiais utilizados na indústria de alimentos. Projeto de Pesquisa. EMBRAPA. CTAA. RJ. 2006.

OLIVEIRA, M. E. B. et al. **Aspectos agronômicos e de qualidade do pequi**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2008. 32p. Disponível em: < https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/pequi2_000g6vgzrwj02wx5ok0wtedt3jlu bacj.pdf>. Acesso em: 20 ago. 2017.

OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.2, p.301-307, 2008.

PASSOS, X. S. et al. Atividade antifúngica de *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae) sobre *Cryptococcus neoformans*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.35, n.6, p.623-627, 2002.

PAULA, N. R. F., et al. Qualidade de produtos minimamente processados e comercializados em gôndolas de supermercados nas cidades de Lavras – MG, Brasília – DF e São Paulo – SP. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 33, n. 1, p. 219-227, jan./fev., 2009.

PAULA-JUNIOR, W. et al. Leishmanicidal, antibacterial, and antioxidant activities of *Caryocar brasiliense* Cambess leave hydroethanolic extract. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.16, p.625-630, 2006.

PENG, J. S.; TSAI, W. C.; CHOU, C. C. Surface characteristics of *Bacillus cereus* and its adhesion to stainless steel. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.65, p.105–111, 2001.

PINHO, L.; SOUZA, P. N. S.; SOBRINHO, E. M.; ALMEIDA, A. C.; MARTINS, E. R. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoolicos das folhas de alecrim- pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi. **Ciência Rural**, v. 42. n. 2, 2012.

RIBEIRO, I. C. O., et al. Plants of the Cerrado with antimicrobial effects against *Staphylococcus* spp. and *Escherichia coli* from cattle. **BMC Veterinary Research**, v. 14, n. 32, jan. 2018.

ROCHA, C. R. et al. Óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. como sanitizante natural para controle de bactérias sésseis em superfície utilizada para corte de alimentos. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 73, n. 4, p. 338-44, 2014.

RODRIGUES, C. S. **Contaminação microbiológica em alface e couve comercializadas no varejo de Brasília-DF**. 2007. 29 p. Monografia (Graduação) – Universidade de Brasília – UnB, Brasília, 2007.

ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C., HOLANDA, R. B.; SOUZA, C. A. S.; PASTORE, G. M. Atividade Antioxidante de frutas do Cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 53-60, 2007.

ROSSONI, E. M. M.; GAYLARDE, C. C. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitizing agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 61, p. 81-85, 2000.

SANTOS, L. A. R.; PIMENTA, L. P. S.; BOAVENTURA, M. A. D. Acetogeninas de anonáceas bioativas isoladas das sementes de *Annona cornifolia* A. St. Hil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 9, n. 3, p. 48-51, 2007.

SANTOS, R. H., et al. Efeito residual da adubação com composto orgânico sobre o crescimento e produção de alface. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 11, p. 1395-1398, 2001.

SANTOS, S. C. & MELLO, J. C. P. Taninos. In: Farmacognosia: da planta ao medicamento. Simões et al., orgs. 5ª ed. Rev. ampl. Porto Alegre/Florianópolis: Editora de UFRGS/editor da UFSC, 615-656p, 2004.

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

SHEIKH, J.; HICKS, S.; DALL'AGNOL, M.; PHILLIPS, A. D.; NATARO, J. P. Roles for Fis and YafK in biofilm formation by enteroaggregative *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v.41, p. 983-97, 2011.

SIMÕES, Cláudia Maria O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2003. 1102p.

SIMÕES, M. et al. Control of flow-generated biofilms using surfactants: evidence of resistance and recovery. **Food and Bioprocess Processing**, v. 84, n. 4, p. 338-345, dez. 2006. Disponível em: <<http://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/6061/1/FPB-Simoes%20%283%29.pdf>>. Acesso em: 20 dez. 2016.

SIMÕES, M.; VIEIRA, M. J. Persister cells in *Pseudomonas fluorescens* biofilms treated with a biocide. In: _____. **Proceedings of the international conference processes in biofilms: fundamentals to applications**. Davis: CRC, 2009. p. 58-62. Disponível em: <http://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/9711/1/Simoes_Vieira2009%5b2%5d.pdf>. Acesso em: 20 dez. 2016.

SOUTO, R. A. Avaliação sanitária da água de irrigação e de alfaces (*Lactuca sativa* L.) produzidas no município de Lagoa Seca, Paraíba. 73 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Agronomia,) – Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2005. Disponível em: <<http://livros01.livrosgratis.com.br/cp000690.pdf>>. Acesso em: 26 mai. 2018.

YAO, L. H.; JIANG, Y. M.; SHI, J.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; DATTA, N.; SINGANUSONG, R.; CHEN, S. S. Flavonoids in Food and their Health Benefits. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 59, p. 113-122, 2004.