



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

PRISCILLA DE ARAÚJO GOIS PINHEIRO GUERRA

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS DE SEMENTES DE MORINGA
(*Moringa oleifera*)**

**FORTALEZA
2016**

PRISCILLA DE ARAÚJO GOIS PINHEIRO GUERRA

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS DE SEMENTES DE MORINGA
(*Moringa oleifera*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Profa. Dra. Evânia Altina Teixeira de Figueiredo.

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

G964a Guerra, Priscilla de Araújo Gois Pinheiro.
Atividade antibacteriana de extratos de sementes de moringa (*Moringa oleifera*) / Priscilla de Araújo Gois Pinheiro Guerra. – 2016.
75 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Fortaleza, 2016.
Orientação: Profa. Dra. Evânia Altina Teixeira de Figueiredo.

1. Moringa oleifera. 2. Antibacteriano. 3. Extratos naturais. I. Título.

CDD 664

PRISCILLA DE ARAÚJO GOIS PINHEIRO GUERRA

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS DE SEMENTES DE MORINGA
(*Moringa oleifera*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos.

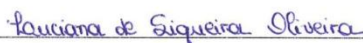
Aprovada em: 29/04/2016.

BANCA EXAMINADORA



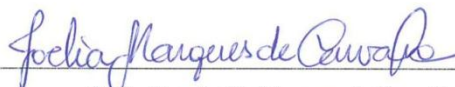
Profa. Dra. Evânia Altina Teixeira de Figueiredo (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará (UFC)



Profa. Dra. Luciana de Siqueira Oliveira

Universidade Federal do Ceará (UFC)



Profa. Dra. Joelia Marques de Carvalho

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE)

A Deus.

Aos meus pais, Welder de Gois Pinheiro Guerra e Ilsa Maria de Araújo Gois, que sempre me apoiaram e me incentivaram nos estudos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, por me conceder essa oportunidade de realizar meu sonho de seguir na vida acadêmica e por colocar as pessoas certas no meu caminho que me dão força e coragem para seguir e a Nossa Senhora por sua intercessão;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro através da concessão da bolsa de auxílio;

À Profa. Dra. Evânia Altina Teixeira de Figueiredo, pela orientação, amizade, por apoiar e confiar em meu trabalho;

Aos membros participantes da banca examinadora, Profa. Dra. Luciana de Siqueira Oliveira e Profa. Dra. Joelia Marques de Carvalho, pela disponibilidade e pelas valiosas contribuições;

Ao Jackson Malveira e à Giovana, pelo apoio, pela amizade e por me permitirem utilizar o Laboratório de Referência em Biocombustíveis Prof. Expedito José de Sá Parente (LARBIO) para fazer parte da minha pesquisa.

Ao Núcleo de Tecnologia Industrial do Ceará (NUTEC), por manter suas portas abertas, servindo de apoio técnico e científico desde a minha graduação;

Ao Horto de Plantas Medicinais Prof. Fco José de Abreu Matos, que me permitiu coletar as sementes de *Moringa oleifera* (objeto do meu estudo) e ao funcionário Dino que sempre se mostrou bastante solícito ao ajudar na coleta;

À Dra. Terezinha (EMBRAPA), pelo apoio técnico e disponibilidade em transmitir seu conhecimento sobre o método de difusão em placa;

À minha família, meu alicerce, por todo apoio que sempre me concederam. Em especial, aos meus pais Welder e Ilsa Maria, por sempre me incentivarem nos estudos e por me darem todo o suporte necessário para seguir, aos meus irmãos Daniel e Welder Segundo pelas palavras de incentivo e às minhas avós Lair e Luzelite, por estarem sempre tão presentes na minha vida e por suas orações;

Ao meu amado noivo, Jailson Silva Rodrigues, pelo suporte, pela paciência e por me ajudar em todos os momentos, principalmente nos mais difíceis, quando cheguei a pensar em desistir, quando me achei incapaz, você me mostrou o contrário, me provou que eu posso fazer o que quiser, basta que eu me dedique e que tenha força e fé. Obrigada também pela preciosa ajuda no desenvolvimento e conclusão do meu trabalho;

À equipe do Laboratório de Microbiologia de Alimentos (LMA), do Departamento de Tecnologia de Alimentos/UFC: Gisani, Danielly, Ana Célia, Jéssica, Kátia, Flayanna, Lucas, por estarem sempre disponíveis a me ajudar, no que fosse necessário;

Às minhas queridas amigas, companheiras de tantos momentos, por fazerem parte da minha vida. Priscila Duarte, Yana Albuquerque, Alice Ramos, Geísa Almeida, Taynara Bezerra, Tamires, Iana, Carine, Ana Angélica. Em especial, à minha querida amiga Elaine Cristina, que sempre esteve ao meu lado desde a graduação e durante o mestrado, quando me deu grande suporte para a realização dos ensaios e me apoiou também com suas palavras de incentivo, mostrando-me que não estou sozinha na batalha;

Aos meus grandes amigos da família LARBIO: Camila, Naele, Flávio, Fernando Pedro, Luzia, e tantos outros que por lá passaram e deixaram muito de si. Agradeço pelas risadas, pelo carinho, pelo compartilhamento de conhecimentos e o mais importante, pela amizade;

Enfim, a todos que contribuíram de forma direta ou indireta com a realização desse trabalho, muito obrigada!

“Se você quiser alguém em quem confiar,
confie em si mesmo. Quem acredita sempre
alcança.”

(Renato Russo / Flávio Venturini)

RESUMO

Na atualidade, é crescente a demanda dos consumidores por alimentos naturais, livres de compostos sintéticos já que estes são, muitas vezes, responsáveis pela incidência de doenças crônicas, como o câncer. Com isso, as indústrias vêm buscando compostos naturais que possam substituir, de forma total ou parcial, essas substâncias. Nesse contexto, os antibacterianos provenientes de fontes vegetais vêm ganhando espaço no mercado e, a *Moringa oleifera*, uma conhecida planta de ação medicinal, pode ser uma excelente alternativa. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana de diferentes extratos de sementes de moringa contra bactérias Gram-positivas (*Alicyclobacillus acidoterrestris*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella Enteritidis*). Os extratos foram produzidos com sementes de moringa colhidas no primeiro (M1) e no segundo (M2) semestres do ano, utilizando-se diferentes solventes: água (EA), hexano (EH) e etanol (EE). Os extratos foram analisados quanto ao conteúdo de polifenóis extraíveis totais pelo método Folin-Ciocalteu e a atividade antimicrobiana, foi avaliada utilizando-se o método de difusão em placa. Realizou-se uma triagem para selecionar os extratos que apresentaram melhor atividade antibacteriana sobre as bactérias utilizadas no estudo e aqueles com melhores resultados foram escolhidos para o ensaio de determinação da concentração inibitória mínima (CIM), variando a concentração dos extratos de 100% a 0,39% (v/v). O conteúdo de polifenóis totais dos extratos variou de $3,51 \pm 0,31$ a $241,76 \pm 15,88$ mg equivalente em ácido gálico (EAG)/g de semente. Nos ensaios, foi observado que o extrato aquoso (EAM2) apresentou ação contra todas as bactérias Gram-positivas, os extratos hexânicos mostraram ação apenas contra o *A. acidoterrestris* e o extrato etanólico (EEM1) teve ação sobre todas as bactérias, com exceção da *S. Enteritidis*. A CIM dos extratos EAM2 e EEM1 foi determinada para *A. acidoterrestris*, *L. monocytogenes* e *S. aureus* obtendo-se os valores do extrato aquoso de 12,5%, 25% e 12,5% (v/v) e do extrato etanólico de 0,78%, 12,5% e 3,12% (v/v), respectivamente. Através dos resultados obtidos conclui-se que os extratos aquoso e etanólico de sementes de *M. oleifera* são potenciais agentes antibacterianos, principalmente contra bactérias Gram-positivas.

Palavras-chave: *Moringa oleifera*. Antibacteriano. Extratos naturais.

ABSTRACT

Nowadays, consumers' demand for natural foods free of synthetic compounds is increasing since they are often responsible for the incidence of chronic diseases, such as cancer. Thererby, the industries have been looking for natural compounds that can replace, totally or partially, these substances. In this sense, antibacterials from plant sources have been gaining more and more space in the market and *Moringa oleifera*, a well-known medicinal plant, can be an excellent alternative. The objective of this study was to evaluate the antibacterial activity of different extracts of moringa seeds against Gram-positive (*Alicyclobacillus acidoterrestris*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*) and Gram-negative bacteria (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella* Enteritidis). The extracts were obtained from moringa seeds harvested in the first (M1) and second (M2) semesters of the year, using different solvents: water (EA), hexane (EH) and ethanol (EE). The extracts were analyzed for the content of total extractable polyphenols by the Folin-Ciocalteau method and the antimicrobial activity was evaluated using the plate diffusion method. Screening was performed to select the extracts which showed the best antibacterial activity over the bacteria used in the study. The best results of antibacterial activity were chosen for the minimum inhibitory concentration (MIC), the concentration of the extracts ranged from 100% to 0,39% (v/v). The total polyphenol contents of the extracts ranged from 3.51 ± 0.31 to 241.76 ± 15.88 mg equivalent in gallic acid (EAG) / g of seed. It was observed that EAM2 showed activity against all Gram-positive bacteria of this work, hexanic extracts activity only against *A. acidoterrestris* and EEM1 on all bacteria (Gram-positive or negative), with the exception of *S. Enteritidis*. The MIC of EAM2 and EEM1 extracts was determined for *A. acidoterrestris*, *L. monocytogenes* and *S. aureus*, the results were of 12.5%, 25% and 12.5% (v/v) to aqueous extract and 0.78%, 12.5% and 3.12% (v/v) to ethanol extract, respectively. It can be concluded that the aqueous and ethanolic extracts of *M. oleifera* seeds are potential antibacterial agents, mainly against Gram-positive bacteria.

Keywords: *Moringa oleifera*. Antibacterial. Natural extracts.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Agentes etiológicos responsáveis pelos surtos de DTA no Brasil nos anos de 2000 a 2015	19
Figura 2 – Planta <i>Moringa oleifera</i> (A); vagem contendo sementes (B)	27
Figura 3 – Gráfico de chuvas mensais no posto pluviométrico Pici em Fortaleza-CE no ano de 2015	33
Figura 4 – Sementes de <i>Moringa oleifera</i> com casca (A); sementes sem casca (B); sementes trituradas e peneiradas (C)	34
Figura 5 – Fluxograma do processo de obtenção do extrato aquoso	34
Figura 6 – Fluxograma do processo de obtenção dos extratos hexânico e etanólico	36
Figura 7 – Curva analítica de calibração do padrão ácido gálico para quantificação de fenóis totais pelo ensaio com o reagente Folin-Ciocalteu	37

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Resultado das avaliações da atividade antibacteriana de extratos de sementes de *Moringa oleifera* pelo método de difusão em ágar contra *A. acidoterrestris* (AA), *L. monocytogenes* (LM), *S. aureus* (SA), *E. coli* (EC), *P. aeruginosa* (PA) e *S. Enteritidis* (SE) 46
- Gráfico 2 – Avaliação da atividade antibacteriana do extrato aquoso em diferentes concentrações contra *A. acidoterrestris*, *L. monocytogenes* e *S. aureus* 51
- Gráfico 3 – Avaliação da atividade antibacteriana do extrato etanólico em diferentes concentrações contra *A. acidoterrestris*, *L. monocytogenes* e *S. aureus* 52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Série histórica de surtos, doentes, expostos e óbitos por DTA. Brasil, 2000 a 2015	19
Tabela 2	– Composição do meio de cultura BAM (DARLAND; BROCK, 1971)	38
Tabela 3	– Meios de cultura empregados nas etapas de isolamento e confirmação das bactérias em estudo	40
Tabela 4	– Meios de cultura utilizados para cada bactéria no método de difusão em ágar	41
Tabela 5	– Quantificação do conteúdo de polifenóis extraíveis totais dos extratos da semente de <i>Moringa oleifera</i>	43
Tabela 6	– Valores da análise de variância (ANOVA)	50

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	Objetivo geral	17
2.2	Objetivos específicos	17
3	REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1	Bactérias de importância em alimentos	18
3.1.1	<i>Listeria monocytogenes</i>	20
3.1.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	21
3.1.3	<i>Escherichia coli</i>	22
3.1.4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23
3.1.5	<i>Salmonella Enteritidis</i>	24
3.1.6	<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	24
3.3	Moringa (<i>Moringa oleifera</i>)	26
3.3.1	<i>Formas de utilização da planta</i>	28
3.3.2	<i>Estudos sobre a bioatividade de M. oleifera</i>	29
3.4	Método para determinação da atividade antibacteriana de extratos de plantas	30
4	MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1	Reagentes e meios de cultura	31
4.2	Obtenção e preparo das sementes de <i>Moringa oleifera</i>	32
4.3	Produção dos extratos	34
4.3.1	<i>Extrato aquoso (EA)</i>	34
4.3.2	<i>Extrato hexânico (EH)</i>	35
4.3.3	<i>Extrato etanólico (EE)</i>	35
4.4	Conteúdo de polifenóis totais (PET)	37
4.5	Preparo dos meios de cultura	37
4.6	Ensaio de atividade antibacteriana	39
4.6.1	<i>Cepas bacterianas</i>	39
4.6.2	<i>Preparo e padronização dos inóculos</i>	39
4.6.3	<i>Preparo de diluições dos extratos</i>	40

4.6.4	<i>Estudo in vitro da atividade antibacteriana dos extratos de moringa (M. oleifera) – Método de difusão em ágar</i>	41
4.7	Concentração inibitória mínima (CIM)	42
4.8	Análise estatística	42
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1	Conteúdo de polifenóis totais (PET)	43
5.2	Atividade antibacteriana	45
5.3	Concentração inibitória mínima (CIM)	50
6	CONCLUSÕES	53
7	PERSPECTIVAS FUTURAS	54
	REFERÊNCIAS	55
	APÊNDICE A – RESULTADO DAS AVALIAÇÕES DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS DE SEMENTES DE MORINGA PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR CONTRA <i>A. acidoterrestris</i> (AA), <i>L. monocytogenes</i> (LM), <i>S. aureus</i> (SA), <i>E. coli</i> (EC), <i>P. aeruginosa</i> (PA) e <i>S. Enteritidis</i> (SE)	65
	APÊNDICE B – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO AQUOSO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES CONTRA <i>A. acidoterrestris</i>, <i>L. monocytogenes</i> e <i>S. aureus</i>	66
	APÊNDICE C – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO ETANÓLICO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES CONTRA <i>A. acidoterrestris</i>, <i>L. monocytogenes</i> e <i>S. aureus</i>	67
	APÊNDICE D – PLACAS CONTENDO MEIO BAM (<i>Bacillus acidocaldarius</i> medium) INOCULADO COM <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	68
	APÊNDICE E – PLACAS CONTENDO ÁGAR MUELLER-HINTON ADICIONADO DE EXTRATO DE LEVEDURA (MHA-YE) INOCULADO COM <i>Listeria monocytogenes</i>	69
	APÊNDICE F – PLACAS CONTENDO ÁGAR MUELLER-HINTON (MHA) INOCULADO COM <i>Staphylococcus aureus</i>	70
	APÊNDICE G – PLACAS CONTENDO ÁGAR MUELLER-HINTON (MHA) INOCULADO COM <i>Escherichia coli</i>	71

APÊNDICE H – PLACAS CONTENDO ÁGAR MUELLER-HINTON (MHA) INOCULADO COM <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	72
APÊNDICE I – PLACAS CONTENDO ÁGAR MUELLER-HINTON (MHA) INOCULADO COM <i>Salmonella Enteritidis</i>	73
APÊNDICE J – PLACAS DO ENSAIO DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DO EXTRATO AQUOSO SOBRE AS BACTÉRIAS <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> (A); <i>Staphylococcus aureus</i> (B) e <i>Listeria monocytogenes</i> (C)	74
APÊNDICE K – PLACAS DO ENSAIO DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DO EXTRATO ETANÓLICO SOBRE AS BACTÉRIAS <i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> (A); <i>Staphylococcus aureus</i> (B) e <i>Listeria monocytogenes</i> (C)	75

1 INTRODUÇÃO

A infecção causada por bactérias é um dos problemas mais ameaçadores para a saúde pública, com impactos social e econômico significativos. Em várias regiões do mundo, os surtos de doenças de origem alimentar podem ter efeitos graves na saúde e, em alguns casos, podem ser fatais. Por outro lado, existem aqueles microrganismos que, apesar de não causarem diretamente prejuízos à saúde humana, apresentam-se como vilões para a indústria de alimentos, estes são os chamados deteriorantes (VOON; BHAT; RUSUL, 2012; LIU *et al.*, 2016).

A deterioração de alimentos causada por bactérias pode ser descrita como a perda das suas propriedades qualitativas no que diz respeito à cor, sabor, textura e odor. Em muitos casos, a qualidade dos alimentos pode ser mantida se o nível de contaminação bacteriana for minimizado (BAUTISTA, 2014).

Os pesquisadores têm sido estimulados a buscarem novos agentes antimicrobianos obtidos a partir de fontes naturais que, em certos casos, podem ser mais eficazes no combate a alguns microrganismos do que os antimicrobianos convencionalmente utilizados. A resistência dos microrganismos patogênicos a uma série de compostos aos quais se mostravam anteriormente sensíveis acarreta na busca de novos compostos com ação antimicrobiana e que sejam preferencialmente naturais (THALLER *et al.*, 2010; VOON; BHAT; RUSUL, 2012). Os vegetais são vistos como uma excelente fonte de substâncias antimicrobianas, e a diversidade molecular desses produtos naturais é, em geral, superior àquela obtida por processo sintético. Estes agentes antimicrobianos naturais podem ser explorados como uma forma natural de conservar alimentos (NOVAIS *et al.*, 2003).

Atualmente, os consumidores têm se preocupado com o uso indiscriminado de compostos químicos ou conservantes artificiais de alimentos, já que esses podem causar efeitos tóxicos ao organismo e doenças crônicas, como o câncer. Em contrapartida, os componentes químicos derivados de plantas são muitas vezes considerados como alternativas mais naturais e seguras em comparação aos sintéticos, tornando-se, portanto, preferíveis para aplicações em alimentos. Assim, percebe-se a necessidade de uma maior exploração científica na linha de base das matérias-primas vegetais que podem ser efetivamente utilizadas como agentes antimicrobianos (VOON; BHAT; RUSUL, 2012; HAN; BHAT, 2014).

A moringa (*Moringa oleifera*) é uma planta perene originária do noroeste da Índia e já bastante difundida no nordeste do Brasil, principalmente no Maranhão, Piauí e Ceará, devido à sua resistência à seca e a temperaturas elevadas, características dessas regiões. É

cultivada comercialmente na Índia, África, América do Sul e Central, México, Havaí, Ásia e Sudeste asiático (STOHS; HARTMAN, 2015). Todas as partes desta planta (flores, folhas, sementes, vagens e caule), por apresentarem uma ampla variedade de constituintes químicos – tais como, minerais, proteínas, vitaminas, carotenoides, aminoácidos, compostos fenólicos e ácidos graxos – são utilizadas com diferentes finalidades como, por exemplo, na nutrição humana e animal, no tratamento de água para consumo humano, nas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia, bem como na produção de biodiesel e lubrificante. Nos últimos anos, a moringa tem sido bastante estudada no âmbito do seu potencial antimicrobiano, mostrando-se uma promissora fonte de compostos que possuem essa função (TALREJA, 2010; RATSHILIVHA *et al.*, 2014).

A segurança alimentar é uma importante questão em todo o mundo, tanto do ponto de vista da indústria de alimentos como da saúde pública. A crescente preocupação sobre o uso de conservantes sintéticos, a descoberta de patógenos de origem alimentar com resistência aos antimicrobianos clássicos, bem como o aumento da demanda dos consumidores por produtos naturais têm gerado muitos desafios tecnológicos à indústria de alimentos, que está cada vez mais motivada para o uso de antimicrobianos naturais, como extratos naturais derivados de plantas, em detrimento de agentes antimicrobianos sintéticos (ZHU *et al.*, 2015; MIAO *et al.*, 2016). A moringa (*Moringa oleifera*) tem se mostrado uma excelente opção como fonte de agente antimicrobiano natural e o objetivo da presente pesquisa é estudar o potencial do extrato da semente para um possível uso em alimentos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antibacteriana de diferentes extratos obtidos a partir da semente da moringa visando sua possibilidade de aplicação como conservante natural na indústria de alimentos.

2.2 Objetivos específicos

- Obter extratos a partir de sementes de *Moringa oleifera* utilizando diferentes solventes: água, hexano e álcool etílico;
- Avaliar as ações antibacterianas dos extratos obtidos contra bactérias Gram-positivas (*Alicyclobacillus acidoterrestris*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella* Enteritidis) em diferentes concentrações;
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos selecionados como agentes antibacterianos;
- Determinar o conteúdo de polifenóis totais e correlacionar com a atividade antibacteriana.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Bactérias de importância em alimentos

Doenças de origem alimentar resultam do consumo de alimentos contaminados com bactérias patogênicas, tais como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, que são responsáveis por casos de infecções ou intoxicações alimentares (IKEDA *et al.*, 2006; KARABIYIKLI; DEGIRMENCI; KARAPINAR, 2014; KIM *et al.*, 2011; ZUNABOVIC; DOMIG; KNEIFEL, 2011;). De modo especial, *Salmonella* Enteritidis, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* são as bactérias de maior importância por serem as mais difundidas em diferentes alimentos em todo o mundo (FU; ZHOU; XING, 2013).

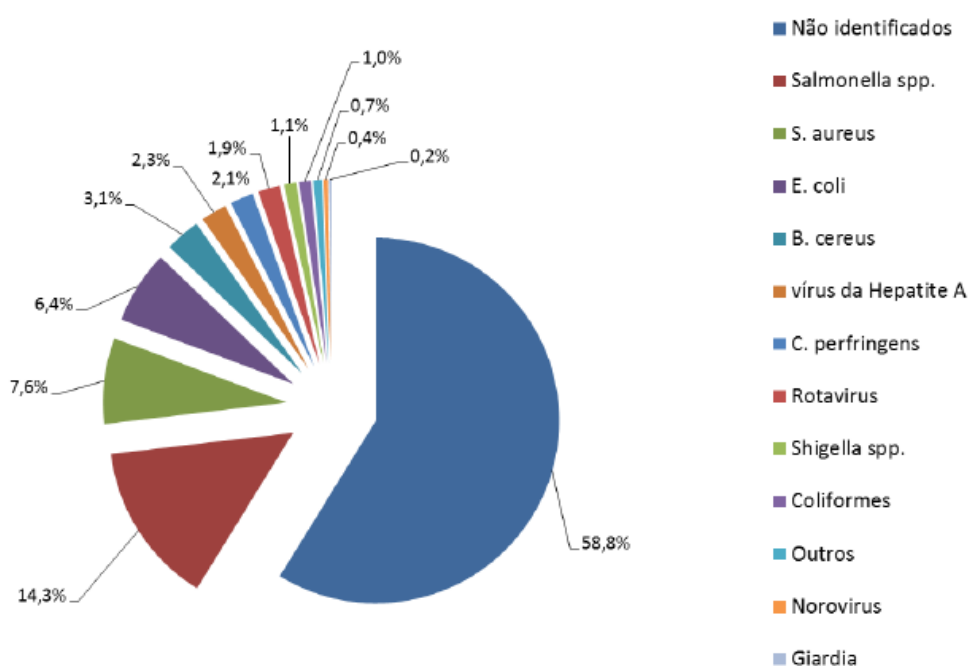
De acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC - USA), de 2009 a 2013, o número de casos de doenças causadas por infecção com bactérias de origem alimentar nos Estados Unidos foi de 29.337. Sendo os principais patógenos responsáveis por esses surtos nos Estados Unidos a *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* (LIU *et al.*, 2016). No Brasil, entre os anos de 2000 e 2015 foram registrados 218.507 casos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) (TABELA 1). Vale salientar que em 58,8 % de todos os casos notificados não foi possível identificar o agente etiológico responsável pelo surto. Entre os casos em que houve identificação do patógeno causador da DTA, percebe-se que *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* são os principais agentes etiológicos associados aos surtos (FIGURA 1). Nesse mesmo período, os principais alimentos envolvidos em surtos de DTA foram, respectivamente, alimentos mistos; ovos e produtos a base de ovos; água; doces e sobremesas; carne bovina *in natura*, processados e miúdos; leite e derivados, com porcentagem dos casos variando de 14,1 a 3,3%, sendo que em 51,4% dos casos de DTA os alimentos responsáveis pelos surtos não foram identificados (DOENÇAS..., 2016). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que, anualmente, mais de um terço da população mundial adquira uma doença transmitida por alimento, mas apenas uma pequena parcela dos casos é notificada (VIGILÂNCIA..., 2014).

Tabela 1 – Série histórica de surtos, doentes, expostos e óbitos por DTA. Brasil, 2000 a 2015

Ano	Surto	Doentes	Expostos	Óbitos	Taxa de letalidade
2000	427	9.535	31.821	5	0,05%
2001	872	15.631	211.228	5	0,03%
2002	806	12.391	116.962	5	0,04%
2003	619	17.910	688.772	4	0,02%
2004	635	21.776	368.109	21	0,010%
2005	913	17.214	242.191	12	0,07%
2006	573	10.312	49.465	8	0,08%
2007	683	11.708	25.195	11	0,09%
2008	641	8.995	23.275	26	0,29%
2009	594	9.431	24.014	12	0,13%
2010	498	8.628	23.954	11	0,13%
2011	795	17.884	52.640	4	0,02%
2012	863	14.670	42.138	10	0,07%
2013	861	17.455	64.340	8	0,05%
2014	886	15.700	124.359	9	0,06%
2015	575	9.267	32.647	7	0,08%
Total	11.241	218.507	2.121.110	158	0,07%

Fonte: SINAN/SVS/Ministério da Saúde *apud* DOENÇAS..., 2016.

Figura 1 – Agentes etiológicos responsáveis pelos surtos de DTA no Brasil nos anos de 2000 a 2015



Fonte: SINAN/SVS/Ministério da Saúde *apud* DOENÇAS..., 2016.

Doenças transmitidas por alimentos são uma ameaça global de saúde pública devido à sua alta prevalência e os custos associados ao tratamento. Até 30% da população que vive em países industrializados sofrem de doenças de origem alimentar a cada ano (RODRÍGUEZ-LÁZARO *et al.*, 2015).

3.1.1 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia facultativa, não formadora de esporos que ocorre comumente em ambientes naturais. Esta bactéria quando ingerida com o alimento pode invadir as células do epitélio intestinal (ALLEN *et al.*, 2016).

Este patógeno intracelular facultativo de origem alimentar tem sido responsável por surtos de listeriose, uma infecção grave que afeta principalmente indivíduos imunocomprometidos, incluindo mulheres grávidas, recém-nascidos e idosos. Os sintomas da doença listeriose assemelham-se aos da gripe com complicações graves, podendo causar meningite, septicemia, aborto espontâneo e uma elevada taxa de mortalidade de aproximadamente 30%. Vários casos de listeriose têm sido associados a alimentos contaminados e essa incidência tende a aumentar, o que causa preocupação generalizada em muitos países (DREVETS; BRONZE, 2008; LIU *et al.*, 2014; AUVOLAT; BESSE, 2016). Os surtos de listeriose de origem alimentar têm sido associados a diferentes tipos de alimentos, entre estes, leite e produtos lácteos, carnes e seus produtos (CARTWRIGHT *et al.*, 2013).

A capacidade da *L. monocytogenes* de persistir em ambientes de processamento de alimentos e a sua capacidade de crescer em temperaturas de refrigeração torna este patógeno uma ameaça significativa para a saúde pública, de forma particular em alimentos refrigerados (MARTÍNEZ-GONZÁLES *et al.*, 2016).

A atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes* foi avaliada com extratos de plantas (KIM *et al.*, 2011); óleos essenciais de canela, tomilho e alecrim e extratos de chalota e açafrão (ABDOLLAHZADEH; REZAEI; HOSSEINI, 2014); casca de romã (*Punica granatum* L.) (HAYRAPETYAN; HAZELEGER; BEUMER, 2012; WU, J. *et al.*, 2016).

Kim *et al.* (2011) avaliaram a atividade antimicrobiana contra *L. monocytogenes* de extratos etanólicos produzidos com as plantas *Terminalia chebula* Retz., *Sophora flavescens* Ait., *Hydnocarpus anthelmintica*, *Rosmarinus officinalis*, *Cannabis sativa*, *Commiphora molmol*, *Morus alba* L., *Agrimonia pilosa* L., *Asarum sieboldii*, *Pinus densiflora*, *Syzygium aromaticum* e *Thuja orientalis* L. Os autores observaram que 10 dos extratos testados apresentaram efeito inibitório, com exceção daqueles produzidos com *H. anthelmintica* e *A. sieboldii*.

O potencial antibacteriano do extrato de casca de romã (*Punica granatum* L.) foi avaliado sobre *L. monocytogenes*. Wu, J., *et al.* (2016) prepararam o extrato com uma solução aquosa de metanol e não observaram inibição significativa do crescimento desse microrganismo nos testes feitos com camarão cozido e atum cru. No entanto, na pesquisa

realizada por Hayrapetyan; Hazeleger; Beumer (2012), que avaliou a inibição de *L. monocytogenes* por extrato da casca de romã em patê de carne, nenhuma célula viável de *L. monocytogenes* foi detectada após a incubação em caldo BHI em presença de 7,5% (v/v) do extrato de romã líquido, sendo esta concentração considerada como a bactericida mínima (CBM) do extrato testado. Uma concentração igual à CBM foi testada contra essa bactéria no patê de carne a diferentes temperaturas e observou-se que a 4°C por 46 dias o extrato inibiu o crescimento do microrganismo, indicando que esse extrato tem um potencial para ser utilizado como um conservante natural em produtos de carne.

3.1.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é uma das bactérias patogênicas mais comuns associadas à intoxicação alimentar em todo o mundo, causando preocupação em programas de segurança alimentar e de saúde pública (HENNEKINNE; DE BUYSER; DRAGACCI, 2012; TERAMOTO; SALAHEEN; BISWAS, 2016). É uma bactéria Gram-positiva amplamente distribuída, e tem sido um dos principais agentes patogênicos de origem alimentar, envolvida em uma variedade de doenças perigosas, incluindo septicemia, osteomielite, pneumonia, síndrome do choque tóxico e endocardite (YANG *et al.*, 2016).

Os casos de intoxicação alimentar estafilocócica são causados pela ingestão de alimentos contendo enterotoxinas que são produzidas por *S. aureus* durante o seu crescimento. Apesar de normalmente ficar em desvantagem em relação a outros microrganismos em uma matriz alimentar, sob condições de estresse bastante encontradas nos alimentos, como acidez moderada e baixos valores de atividade de água (aw) devido à alta concentração de açúcar, apresenta uma boa vantagem de crescimento em comparação a outras bactérias (SIHTO *et al.*, 2016).

O efeito da atividade antibacteriana de extratos de *Zehneria acabra* e *Ricinus communis* (ABEW; SAHILE; MOGES, 2014); *Sanguisorba officinalis* L. (CHEN *et al.*, 2015); chá verde e NaCl (NAKAYAMA *et al.*, 2012); romã (*Punica granatum* L.) (PAGLIARULO *et al.*, 2016); goiaba (*Psidium guajava*), chá verde (*Camellia sinensis*), nim (*Azadirachta indica*) e margarida (*Calendula officinalis*) (FARJANA; ZERIN; KABIR, 2014) foi avaliado sobre o crescimento de *S. aureus*.

No trabalho de Abew, Sahile e Moges (2014) foram estudadas as atividades antibacterianas dos extratos de folhas de *Zehneria scabra* e *Ricinus communis*. Os extratos foram produzidos sucessivamente com solventes orgânicos de polaridade crescente (benzeno,

clorofórmio: acetona (1:1), 70% de álcool e água destilada). A susceptibilidade antibacteriana foi testada usando o método de difusão em ágar. *S. aureus* mostrou-se sensível aos extratos, com zona de inibição de $14,00 \pm 1,20$ mm para *Z. scabra* e $15,90 \pm 2,13$ para *R. communis*.

3.1.3 *Escherichia coli*

Escherichia coli são bacilos Gram-negativos pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, anaeróbios facultativos e ocorrem na maior parte do trato gastrointestinal do homem e de outros animais hospedeiros. Eles podem crescer em um pH de 5 a 9, mas podem sobreviver a uma exposição rápida até pH 2, o necessário para passar pelo ambiente ácido do estômago e colonizar o intestino (BAKER *et al.*, 2016). É uma bactéria que pode atuar de forma comensal no intestino humano, interagindo de forma benéfica ao impedir a colonização de patógenos, por competição. No entanto, *E. coli* pode se comportar de forma oportunista, causando doenças em hospedeiros suscetíveis, tais como, crianças, idosos e pessoas imunodeprimidas. Esse microrganismo também pode se apresentar na forma patogênica, classificando-se por seus mecanismos de patogenicidade, incluindo: *E. coli* enteropatogênica (EPEC); *E. coli* enterotoxigênica (ETEC); *E. coli* enterohemorrágica (EHEC); *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) (SOUSA, 2006; ELSAS *et al.*, 2011).

No campo, a água contaminada, poeira contendo adubos, animais selvagens e insetos podem servir como fontes de contaminação de produtos alimentícios com *E. coli* (BERGER *et al.*, 2010).

A eficácia antibacteriana sobre *E. coli* foi avaliada utilizando-se extratos de *Zehneria acabra* e *Ricinus communis* (ABEW; SAHILE; MOGES, 2014) romã (*Punica granatum* L.) (PAGLIARULO *et al.*, 2016); goiaba (*Psidium guajava*), chá verde (*Camellia sinensis*), nim (*Azadirachta indica*) e margarida (*Calendula officinalis*) (FARJANA; ZERIN; KABIR, 2014).

O estudo realizado por Farjana, Zerín e Kabir (2014), com os extratos de folhas de goiaba, chá verde, nim e calêndula, utilizou o método de difusão em ágar para avaliação da atividade antibacteriana. O extrato aquoso de folhas de nim foi o único que apresentou algum efeito inibitório sobre o crescimento de *E. coli*, com uma moderada zona de inibição de 10 mm (FARJANA; ZERIN; KABIR, 2014). O efeito inibidor de extratos de polifenóis de romã (*Punica granatum* L.) sobre o crescimento bacteriano de *S. aureus* e *E. coli* foi avaliado por Pagliarulo, *et al.* (2016). Os extratos de romã foram obtidos homogeneizando-se o suco, obtido da prensagem do fruto, e a casca (seca e pulverizada) em uma solução etanol / água a

50% (v/v). O espectro inibitório dos extratos contra os microrganismos citados foi avaliado pelo método de difusão em ágar. Os resultados mostram que os extratos de romã possuem uma atividade antimicrobiana eficaz, evidenciado pelo efeito inibitório sobre o crescimento de *S. aureus* e *E. coli*.

3.1.4 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa é uma bactéria Gram-negativa que possui uma variedade de fatores de virulência que são principalmente responsáveis pela sua patogenicidade, no entanto, é conhecida por ser um patógeno oportunista, ou seja, que raramente causa doenças em um indivíduo saudável, mas pode causar grave infecção em um organismo com sistema imunológico debilitado (SHI *et al.*, 2012). A disseminação de patógenos altamente virulentos é também um grande problema em todo o mundo no controle e precaução de doenças transmitidas por alimentos e estudos epidemiológicos (WU, Q., *et al.*, 2016).

Pseudomonas spp. e outras bactérias psicotróficas tendem a ser dominantes em alimentos proteicos, tais como carnes, aves, leite e peixe armazenados aerobicamente a temperatura de refrigeração, podendo causar a deterioração desses produtos (GRAM *et al.*, 2002).

Extratos de goiaba (*Psidium guajava*), chá verde (*Camellia sinensis*), nim (*Azadirachta indica*) e calêndula (*Calendula officinalis*) tiveram a sua atividade antibacteriana avaliada contra *Pseudomonas* spp, desses os que apresentaram efeito inibitório sobre o crescimento da bactéria foram os extratos metanólicos de folhas de chá verde e goiaba com a mesma zona de inibição medindo 18 mm (FARJANA; ZERIN; KABIR, 2014).

Careaga *et al.* (2003) avaliaram a atividade antibacteriana de extrato de pimenta (*Capsicum annuum*) em *P. aeruginosa* inoculada em carne crua. Foram adicionadas diferentes concentrações do extrato na carne picada a qual foi armazenada a 7°C por 7 dias. Avaliou-se também o efeito combinado do extrato de *C. annuum* e cloreto de sódio sobre o crescimento bacteriano. Os autores observaram efeito bacteriostático em uma concentração de 0,3 mL de extrato/100g de carne e bactericida na concentração de 3 mL/100 g de carne. Ao se adicionar 1% v/v de cloreto de sódio à carne em conjunto com o extrato, a concentração necessária para matar *P. aeruginosa* foi reduzida.

3.1.5 *Salmonella* Enteritidis

Salmonella é um gênero de bactérias que possuem motilidade, não formador de esporos, Gram-negativo, pertencente à família *Enterobacteriaceae*. A espécie *S. enterica*, que é a maior preocupação da saúde pública, é composta por seis subespécies, entre elas, a *S. enterica* subsp. *enterica*, que por sua vez é dividida em vários sorotipos, incluindo *S. Enteritidis* (FOODBORNE..., 2012).

S. Enteritidis pode causar salmonelose não-tifóide, que é um tipo de salmonelose mais brando, embora também possa ser fatal mesmo em pessoas saudáveis. Os principais sintomas são náuseas, vômitos, cólicas abdominais, diarreia, febre e dor de cabeça, podendo também ocorrer complicações em alguns casos. Este microrganismo pode facilmente contaminar carnes, água de irrigação agrícola e, por sua vez, produtos do campo, solo e insetos, equipamentos de fábrica, mãos e ainda superfícies e utensílios de cozinha (FOODBORNE..., 2012).

Tradicionalmente a *Salmonella* é associada a produtos de origem animal, no entanto, produtos frescos também têm sido causa de surtos de salmoneloses. Este organismo também pode sobreviver em alimentos de baixa umidade, tais como condimentos (FOODBORNE..., 2012).

Farjana, Zerín e Kabir (2014) estudaram a atividade antibacteriana sobre *Salmonella* spp. de extratos folhas de goiaba (*Psidium guajava*), chá verde (*Camellia sinensis*), nim (*Azadirachta indica*) e margarida (*Calendula officinalis*). O ensaio foi realizado utilizando-se o método de difusão em ágar, no entanto, *Salmonella* spp. não se mostrou sensível a nenhum dos extratos testados.

3.1.6 *Alicyclobacillus acidoterrestris*

A deterioração de alimentos é caracterizada por alterações sensoriais (cor, odor, sabor e textura) em um produto alimentício, que o torna inaceitável para o consumidor. O crescimento de microrganismos deteriorantes é a principal causa dessa deterioração. Apesar de cuidados como a manutenção da cadeia de frio e da adição de conservantes químicos, estima-se que 25% de todos os alimentos produzidos em todo o mundo são perdidos pós-colheita ou após o abate devido à deterioração microbiana (GRAM *et al.*, 2002).

Todo produto alimentício abriga uma microbiota específica durante a sua produção e armazenamento, a qual, sob condições ideais, pode crescer e causar a deterioração

do alimento. O suco de fruta é um exemplo de produto facilmente deteriorável por conter altos níveis de açúcares e outros nutrientes que facilitam o crescimento microbiano. O seu pH normalmente baixo favorece a deterioração desse produto por fungos e bactérias acidófilas, em muitos casos até mesmo após o tratamento térmico de pasteurização (GOUMA *et al.*, 2015).

O gênero *Alicyclobacillus* é caracterizado pela formação de um endósporo e pela presença de um ácido graxo ω -alicíclico como um importante ácido graxo celular. *A. acidoterrestris* é um deteriorante de sucos, termoacidófilo, ou seja, é resistente ao calor sendo, portanto, capaz de sobreviver aos procedimentos de pasteurização normalmente aplicados aos sucos de frutas. Essa bactéria pode crescer em um intervalo de pH de 2,2 a 5,8 e temperaturas variando de 23 a 55°C (BAUMGART, 2003; FERRARIO; ALZAMORA; GUERRERO, 2015; PORALLA; KÖNIG, 1983).

Segundo Matsubara *et al.* (2002), *Alicyclobacillus* são considerados como habitantes do solo, os quais podem, através das matérias-primas, contaminar e crescer em sucos de frutas, principalmente ácidos. Como o solo é a principal fonte de contaminação de frutas frescas durante a colheita e, normalmente, o *Alicyclobacillus* é proveniente desse habitat, ocorre uma predominância dessa bactéria como contaminante de produtos de frutas sendo, portanto, o organismo alvo no controle de qualidade na produção de bebidas ácidas (STEYN; CAMERON; WITTHUHN, 2011).

Uma das medidas de controle de *Alicyclobacillus* na indústria de sucos seria impedir ou reduzir a entrada desse microrganismo na produção proibindo o uso de frutos caídos durante a elaboração de suco concentrado e estabelecendo procedimentos de lavagem completa de frutas antes de entrar no ambiente de processamento. Algumas das técnicas de lavagem adotadas pela indústria já incluem a utilização de desinfetantes e agentes químicos com a finalidade de reduzir os níveis de *Alicyclobacillus* na superfície das frutas (STEYN; CAMERON; WITTHUHN, 2011).

A atividade antimicrobiana de extrato de semente de uva foi avaliada contra células vegetativas e esporos de *A. acidoterrestris* em suco de maçã (pH 3,82 e 11,3 °Brix). O estudo foi realizado a temperatura de 37 °C nos tempos zero, 24, 48, 72, 168, 240 e 336 h. Observou-se que a atividade antibacteriana do extrato, em todas as concentrações testadas, causou redução significativa nas contagens de células, mas não eliminou completamente a população microbiana sob as condições testadas. Este estudo destacou o potencial uso dos subprodutos da indústria de suco de fruta como antimicrobianos naturais para inibir o crescimento de *A. acidoterrestris* (MOLVA; BAYSAL, 2015a).

Piskernik *et al.* (2016) estudaram a atividade antimicrobiana de dois extratos comerciais de alecrim contra cepas de *Alicyclobacillus*, com o objetivo de determinar se estes podem ser utilizados em suco de maçã para o controle do crescimento desses microrganismos. O estudo da cinética de crescimento com os extratos de alecrim indicaram uma redução em células vegetativas de *A. acidoterrestris*, *A. hesperidum* e *A. cycloheptanicus* em caldo *Bacillus acidoterrestris* (BAT) e em suco de maçã. Estudos com esporos de *A. acidoterrestris* mostraram que as concentrações inibitórias mínimas (MICs) desses extratos de alecrim tiveram efeitos relativamente baixos no número de esporos em caldo *Bacillus acidoterrestris*, mas mostraram um índice de inibição de esporos maior que 15% em suco de maçã. No entanto, o aumento de quatro vezes nas concentrações dos extratos apresentou maior redução em esporos em caldo *Bacillus acidoterrestris* do que no suco de maçã. Segundo os autores, os extratos de alecrim aplicados em suas MICs representam, portanto, um método alternativo para o controle de *A. acidoterrestris* em suco de maçã.

3.3 Moringa (*Moringa oleifera*)

A *Moringa oleifera* é uma planta tropical que pertence à família Moringaceae bastante conhecida e largamente distribuída em muitos países tropicais e subtropicais, sendo nativa da Índia e amplamente cultivada nas regiões da África, Arábia, ilhas do Caribe e do Pacífico e América do Sul (ANWAR; ASHRAF; BHANGER, 2005; FERNANDES *et al.*, 2015; RATSHILIVHA *et al.*, 2014). A moringa foi introduzida no Brasil como planta ornamental por volta de 1950 e, desde então, tem sido amplamente cultivada na região Nordeste, mais precisamente nos estados do Maranhão, Piauí e Ceará, onde é conhecida como lírio branco, quiabo de quina ou simplesmente moringa (BRILHANTE *et al.*, 2015).

É uma espécie de planta bastante tolerante à seca, que pode florescer e produzir frutos mesmo com escassez de chuva (RAMACHANDRAN; PETER; GOPALAKRISHNAN, 1980). Atinge até 10 m de altura e possui folhas grandes e flores brancas ou creme, suas vagens são longas e podem conter de 10 a 20 sementes globoides (FIGURA 2) (TSAKNIS *et al.*, 1999).

Figura 2 – Planta *Moringa oleifera* (A); vagem contendo sementes (B)



Fonte: Autoria própria.

Local: Horto de Plantas Medicinais Prof. Fco José de Abreu Matos

Diferentes partes desta planta (folhas, flores, sementes, vagens entre outras) contém um perfil de minerais importantes, tais como cálcio, fósforo, magnésio, potássio, sódio, enxofre, zinco, cobre, manganês, ferro e selênio, sendo também boas fontes de proteínas, vitaminas, β -caroteno, aminoácidos e muitos compostos fenólicos (BUKAR; UBA; OYEYI, 2010; MOYO *et al.*, 2012). São utilizadas na alimentação, como um vegetal altamente nutritivo, em países como Índia, Paquistão, Filipinas, Havaí e em muitos países africanos (ANWAR *et al.*, 2007; GOVARDHAN; NEGI; RADHA, 2013).

As folhas contêm vários tipos de compostos antioxidantes, por exemplo: ácido ascórbico, flavonoides, fenólicos e carotenoides (ALHAKMANI; KUMAR; KHAN, 2013; MOYO *et al.*, 2012; VONGSAK; SITHISARN; GRITSANAPAN, 2014) são também boas fontes de proteína, minerais e aminoácidos essenciais, tais como metionina, cisteína, triptofano e lisina (SÁNCHEZ-MACHADO *et al.*, 2009). Govardhan, Negi e Radha (2013) identificaram e quantificaram dez compostos fenólicos presentes em farinha de semente de *Moringa oleifera* desengordurada: ácido gálico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido cafeico, ácido procatecuico, ácido cinâmico, catequina, epicatequina, vanilina e quercetina. A extração desses compostos foi realizada usando cinco solventes (etanol, metanol, acetona, hexano e clorofórmio) com a razão solvente / farinha 10:1 (v/m).

3.3.1 Formas de utilização da planta

A moringa (*M. oleifera*) pode ser explorada com diversas finalidades, tais como nutrição humana e animal, emprego nas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia e obtenção de lubrificante e biodiesel (DEBNATH *et al.*, 2011; FERNANDES *et al.*, 2015; SHARMA *et al.*, 2009). É bastante utilizada como matéria-prima no tratamento de água para consumo humano. As suas sementes possuem proteínas coagulantes que tornam a água potável e são comparadas aos coagulantes químicos em termo de eficácia e, por ser um produto biodegradável, pode ter seu uso mais difundido (PRITCHARD *et al.*, 2010).

Todas as partes da árvore *M. oleifera* são comestíveis e têm sido consumidas por seres humanos (TALREJA, 2010), sendo considerada uma boa alternativa na alimentação humana e animal por apresentar importantes minerais, como ferro, além de ser uma fonte de vitaminas, como β -caroteno, e de aminoácidos, como metionina e cistina (ANWAR *et al.*, 2007).

Na Índia, essa planta é tradicionalmente utilizada como erva medicinal, atuando como antibiótico, antitripanossomal, hipotensor, antiulcerígeno, antiespasmótico, anti-inflamatório, hipocolesterômico, hepatoprotetor, antioxidante, hipoglicemiante, diurético, entre outros (BIJINA *et al.*, 2011; CACERES *et al.*, 1992; CHEENPRACHA *et al.*, 2010; DEBNATH *et al.*, 2011; JAISWAL *et al.*, 2009; MEHTA *et al.*, 2003; PALIWAL; SHARMA; PRACHETA, 2011).

No trabalho descrito por Siddhuraju e Becker (2003) relata-se que as folhas de moringa aumentaram significativamente a vida de prateleira de manteiga líquida e, pesquisas mais recente, mostraram que os extratos das folhas de *M. oleifera* protegeram rissoles de carne de cabra contra o ranço oxidativo e também tiveram um significativo potencial antioxidante e antimicrobiano em salsichas de frango, não apresentando qualquer alteração sensorial no produto (DAS *et al.*, 2012; JAYAWARDANA *et al.*, 2015).

Hazra *et al.* (2012) ao avaliarem os efeitos dos extratos brutos das folhas de *M. oleifera* sobre a carne cozida de búfalo, evidenciaram efeitos antioxidante e antimicrobiano, bem como um aumento da qualidade da carne no que se refere à maciez, suculência e manutenção da cor. O que mostra a sua possível utilização como aditivo em alimentos, substituindo de forma total ou parcial os compostos sintéticos com função antioxidante e/ou antimicrobiana.

3.3.2 Estudos sobre a bioatividade de *M. oleifera*

Muitos trabalhos revelam a bioatividade de partes da árvore moringa. As propriedades antimicrobianas de *M. oleifera* têm sido atribuídas a diferentes partes da planta, tais como folhas, flores, sementes, vagens e caules (FERREIRA *et al.*, 2011; ARORA; ONSARE; KUAR, 2013; ROCHA *et al.*, 2014).

Brilhante *et al.* (2015) investigaram o potencial antimicrobiano *in vitro* de extratos etanólicos de caule, folhas, vagens e sementes de *M. oleifera* contra *Vibrio* spp e concluíram que as vagens e as folhas têm potencial para o controle de *Vibrio* spp. No entanto, o extrato etanólico de sementes de *M. oleifera* mostrou uma baixa eficácia em inibir o crescimento deste microrganismo.

Extratos aquosos e etanólicos de sementes de moringa (*M. oleifera*) também tiveram seu efeito antibacteriano avaliado frente a *S. aureus*, *V. cholerae*, *E. coli* (isolada de pescados e ambiente aquático) e *S. Enteritidis*. Ambos os extratos foram testados nas concentrações de 1:5 e 1:10, nos volumes de 50, 100, 150 e 200 µL. Os autores observaram efeito antibacteriano (halo de inibição > 13 mm) dos extratos aquosos e etanólicos de moringa sobre *S. aureus*, *V. cholerae* e *E. coli* isoladas de camarão cinza *Litopenaeus vannamei*. A cepa de *E. coli* isolada do peixe *Oreochromis niloticus* foi sensível ao extrato etanólico de moringa (VIEIRA *et al.*, 2010).

A atividade antibacteriana de extratos de metanol e n-hexano de sementes de *Moringa oleifera* e *Moringa stenopetala* foram avaliadas contra *Salmonella typhi*, *V. cholerae* e *E. coli*. Nos testes foi empregado o método de difusão em disco de papel. A maior inibição foi observada nas diluições 20, 5 e 40% de extratos metanólicos de *M. oleifera* e *M. stenopetala* sobre *E. coli*, *S. typhi* e *V. cholerae* respectivamente. *S. typhi* foi mais sensível aos extratos n-hexano de *M. oleifera* e *M. stenopetala* do que *V. cholerae* e *E. coli*. O estudo concluiu que *M. oleifera* e *M. stenopetala* tiveram um grau de propriedades antibacterianas, especialmente em baixas concentrações (ATIENO *et al.*, 2011).

O perfil antimicrobiano de extratos de clorofórmio e etanol de sementes e folhas de *M. oleifera* foi avaliado contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Enterobacter aerogenes*, *S. typhi*, *Salmonella typhimurium* e *Shigella* spp. Os resultados do estudo mostraram que o extrato etanólico de folha de *M. oleifera* exibiu um largo espectro de atividade contra os organismos *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *E. aerogenes*. Os valores da concentração inibitória mínima (MIC) variaram entre 2,0 e >4,0 mg/mL para todos os organismos. O extrato da semente produzido com clorofórmio foi ativo somente contra *E. coli* e *S.*

typhimurium, sendo que os valores da MIC variaram entre 1,0 e >4,0 mg/mL, respectivamente. O resultado desse estudo mostrou os extratos de *Moringa oleifera* como potenciais agentes sanitizantes por inibir o crescimento dos organismos testados, que vão de patógenos causadores de doença de origem alimentar a deterioradores de alimentos (BUKAR; UBA; OYEYI, 2010).

Jayawardana *et al.* (2015) avaliaram a capacidade antioxidante e atividade antimicrobiana de folhas de moringa (*M. oleifera*) quando incorporadas em salsichas de frango. As folhas de moringa foram adicionadas nas salsichas em diferentes concentrações (0,25%, 0,5%, 0,75% e 1%), foram preparados também dois controles sem folhas de moringa (um com antioxidante artificial e outro sem qualquer antioxidante). As análises de pH e microbianas (contagem total em placa para *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*) foram realizadas durante a primeira até a quinta semana de armazenamento sob condições de refrigeração (4 °C). As salsichas com 0,5%, 0,75% e 1% de folhas de moringa mostraram significativamente ($p < 0,05$) os valores de pH baixos a partir da 2ª até a 5ª semana de armazenamento e de forma significativa ($p < 0,05$) baixa contagem total em placa durante todo o período de armazenamento, quando comparado com a amostra contendo 0,25% de folhas de moringa e com as duas amostras controle. Não foi detectada diferença em qualquer atributo sensorial das salsichas que continham 0,25% e 0,5% de folhas de moringa em comparação aos controles. Os autores observaram nesse estudo um significativo potencial antioxidante e antimicrobiano de moringa em salsichas de frango.

3.4 Método para determinação da atividade antibacteriana de extratos de plantas

Existem diferentes métodos que podem ser utilizados para a determinação da atividade antimicrobiana de extratos de plantas e óleos essenciais. As técnicas mais empregadas são: O método de difusão em Agar (utilizando-se disco de papel embebido com o extrato a ser testado ou fazendo-se uma cavidade / poço no Agar onde será adicionado o extrato) e o método de diluição (Agar ou caldo) (VOON; BHAT; RUSUL, 2012).

Uma vez que esses métodos adotam princípios diferentes, os resultados obtidos podem divergir entre si. Outros fatores também podem afetar os resultados dos testes de sensibilidade aos antimicrobianos, como os microrganismos testados e o grau de solubilidade de cada composto em análise (VALGAS *et al.*, 2007).

No método de difusão em ágar (disco de papel ou poço), as placas contendo ágar são inoculadas com o microrganismo teste, então os extratos de plantas ou óleos essenciais

são aplicados diretamente em um disco de papel, que são colocados na superfície do ágar ou dentro das cavidades ou poços feitos no ágar. As placas são incubadas na temperatura ideal para o crescimento do microrganismo em teste e para que ocorra a difusão da substância no meio. O diâmetro da zona de inibição em torno dos discos ou poços é uma indicação de eficácia do material provado (VOON; BHAT; RUSUL, 2012).

Diferentes métodos foram utilizados para determinar a atividade antimicrobiana de extratos naturais, incluindo os de *M. oleifera*. Entre esses, os ensaios de difusão em ágar são bastante empregados.

Arora e Onsare (2014) avaliaram a atividade antimicrobiana *in vitro* das cascas das vagens de moringa contra bactérias Gram positivas, Gram negativas. Nesse estudo, a concentração inibitória mínima (CIM) do extrato de acetona de cascas de vagem de *M. oleifera* foi determinada através do método de diluição em ágar. Os valores de CIM variaram com diferentes microrganismos, exceto para *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella typhimurium* 1, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* 1 onde se observou um valor de CIM semelhante a 400 mg/L.

O efeito antibacteriano (*in vitro*) de extratos aquosos e etanólicos de sementes de moringa (*Moringa oleifera*) e casca de graviola (*Annona muricata*) contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas foi estudado por Vieira *et al.* (2010). O ensaio foi realizado utilizando-se o método de difusão em ágar e na avaliação dos resultados consideraram-se eficazes os extratos que produziram halos de inibição do crescimento bacteriano superiores a 13 mm. Os extratos foram testados nas concentrações de 1:5 e 1:10 e nos volumes de 50, 100, 150 e 200 µL. Os autores observaram efeito antibacteriano (halo de inibição > 13 mm) dos extratos aquosos e etanólicos de moringa frente a *S. aureus*, *V. cholerae* e *E. coli* isoladas de camarão cinza *Litopenaeus vannamei*, enquanto a cepa de *E. coli* isolada do peixe *Oreochromis niloticus* apresentou sensibilidade apenas ao extrato etanólico de moringa. *S. aureus* e *V. cholerae* também foram sensíveis aos extratos aquosos de graviola. Nenhum dos microrganismos em teste mostrou sensibilidade aos extratos etanólicos dessa planta.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes e meios de cultura

Os reagentes utilizados neste trabalho foram: sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄), Vetec 99%; sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO₄ . 7H₂O), Vetec 98%; cloreto de

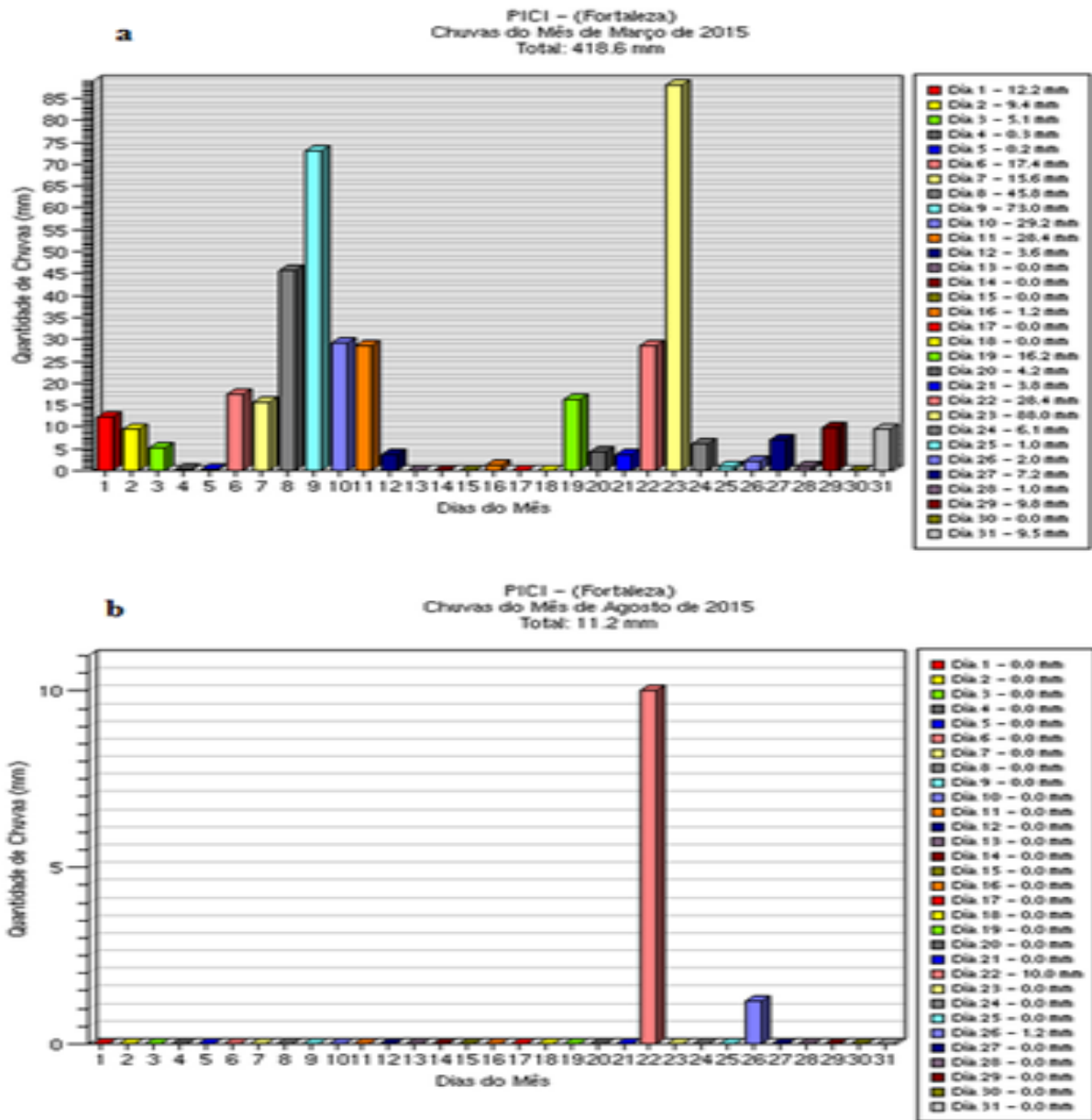
cálcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), Sigma-Aldrich 97%; fosfato monopotássico (KH_2PO_4), Sigma-Aldrich 98%; álcool etílico, Sigma-Aldrich 99,5%; hexano, Vetec 99%; ácido sulfúrico (H_2SO_4), Vetec 99%; ácido L (+) tartárico, Vetec 99%; glicose, QEEL; ágar, BACTO™; ágar tripticase de soja (TSA/ OXOID), TSA adicionado de extrato de levedura (YE/ BACTO™), caldo tripticase de soja (TSB/DIFCO), caldo infusão cérebro coração (BHI/BACTO™), meio *Bacillus acidocaldarius* (BAM) e caldo *Bacillus acidocaldarius* (BAM), ágar entérico de hecktoen (HE/OXOID), *Pseudomonas* ágar base (PAB/OXOID), ágar palcam (PAL/DIFCO™), ágar McConkey (MAC/HIMEDIA), ágar baird-parker (BP/DIFCO), ágar Mueller-Hinton (MHA/ OXOID), MHA adicionado de extrato de levedura (MHA-YE), ágar Mueller-Hinton acidificado com ácido tartárico a 10% (MHAa) e água destilada.

4.2 Obtenção e preparo das sementes de *Moringa oleifera*

As vagens contendo as sementes de *Moringa oleifera* foram coletadas no Horto de Plantas Medicinais Prof. Francisco José de Abreu Matos localizado no Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará. As colheitas foram realizadas em duas épocas diferentes do ano de 2015, sendo a primeira (M1) no mês de março, período que foi bastante chuvoso. Enquanto a segunda colheita (M2) foi realizada no mês de agosto, período de baixa pluviosidade.

Na Figura 3, observa-se que no período do mês de março de 2015, quando foram colhidas as sementes M1, o índice pluviométrico foi consideravelmente maior (418,6 mm) quando comparado ao mês de agosto do mesmo ano, época de colheita das sementes M2, cujo volume de chuvas foi de apenas 11,2 mm (FUNDAÇÃO CEARENSE DE METEOROLOGIA E RECURSOS HÍDRICOS, 2015).

Figura 3 – Gráfico de chuvas mensais no posto pluviométrico Pici em Fortaleza-CE no ano de 2015

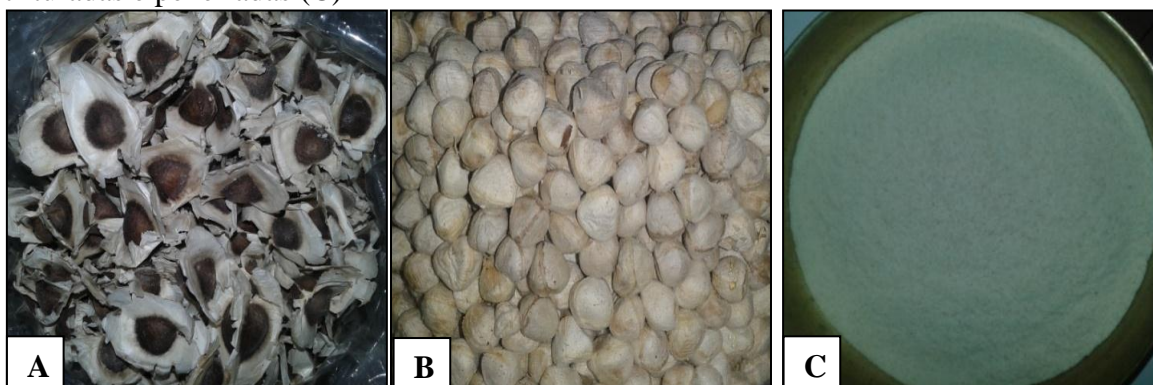


a – Quantidade de chuvas (mm) no mês de março de 2015; b – Quantidade de chuvas (mm) no mês de agosto de 2015

Fonte: FUNDAÇÃO CEARENSE DE METEOROLOGIA E RECURSOS HÍDRICOS, 2015.

Após a colheita, as sementes foram acondicionadas em sacolas plásticas e levadas ao Laboratório de Referência em Biocombustíveis Prof. Expedito José de Sá Parente (LARBio), localizado no Núcleo de Tecnologia Industrial do Ceará (NUTec) para a realização dos procedimentos de extração. Para isso, as sementes passaram pelos processos de descascamento e secagem em estufa a 40 °C durante 24 h, em seguida foram trituradas em um liquidificador industrial e peneiradas (0,84 mm). Então seguiram para a extração com três tipos diferentes de solventes: água, hexano e etanol.

Figura 4 – Sementes de *Moringa oleifera* com casca (A); sementes sem casca (B); sementes trituradas e peneiradas (C)



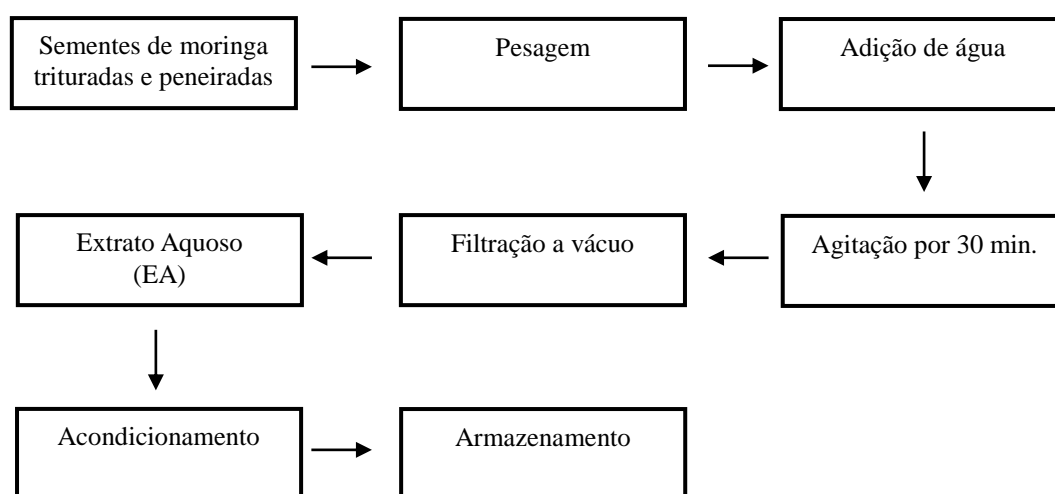
Fonte: Autoria própria.

4.3 Produção dos extratos

4.3.1 Extrato aquoso (EA)

Para o preparo do extrato aquoso de moringa, 30g das sementes trituradas foram homogeneizadas com 150 mL de água destilada estéril em um frasco Erlenmeyer (500 mL), permanecendo por 30 min sob agitação, com o auxílio de um agitador magnético. A mistura foi filtrada em papel de filtro sob vácuo e armazenada em temperatura de refrigeração (4 °C) para análises posteriores (VIEIRA *et al.*, 2010). O processo de extração está descrito no fluxograma abaixo (Figura 5).

Figura 5 – Fluxograma do processo de obtenção do extrato aquoso



Fonte: Elaborada pela autora.

4.3.2 Extrato hexânico (EH)

Foram pesadas 112 g das sementes trituradas e peneiradas de *Moringa oleifera* em um frasco Erlenmeyer (500 mL). Em seguida, adicionaram-se 300 mL de hexano P.A. permanecendo o sistema em repouso a temperatura ambiente (25°C). A fase líquida foi separada da sólida por filtração em papel de filtro e, a cada 24 h o processo foi repetido em um total de três dias. Ao final das extrações, o solvente foi evaporado e recuperado em um evaporador rotativo (Quimis) a 40 °C, obtendo-se um fluido viscoso de coloração amarelada (Adaptado de Atieno *et al.* (2011)).

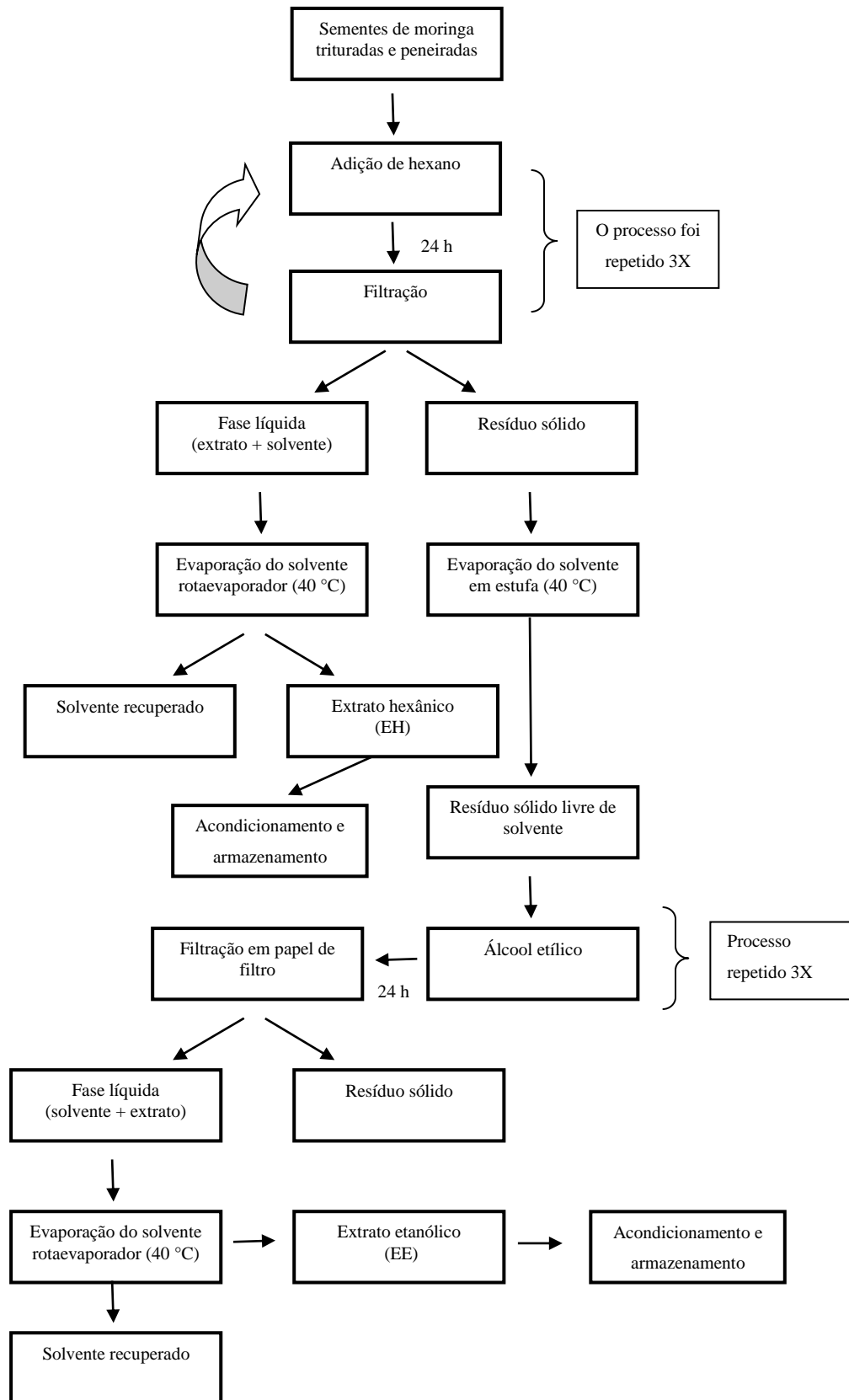
4.3.3 Extrato etanólico (EE)

Após a extração com hexano, o resíduo sólido obtido foi levado para a estufa a 40 °C durante 2 h para evaporação total do solvente, em seguida, adicionaram-se 300 mL de álcool etílico P.A ao resíduo sólido (74,82 g). A extração seguiu como a anterior, retirando a fase líquida (extrato com solvente) e adicionando álcool etílico a cada 24 h por um período de três dias (FIGURA 6).

O solvente foi então separado em um evaporador rotativo (Quimis) a 40 °C e o produto obtido apresentou-se como um fluido viscoso de coloração escura (VIEIRA *et al.*, 2010; ATIENO *et al.*, 2011; PEIXOTO *et al.*, 2011). Os processos de extração hexânico e etanólico estão representados no fluxograma da Figura 6.

Todos os extratos produzidos foram armazenados sob refrigeração (4°C) até a sua utilização nos ensaios.

Figura 6 – Fluxograma do processo de obtenção dos extratos hexânico e etanólico

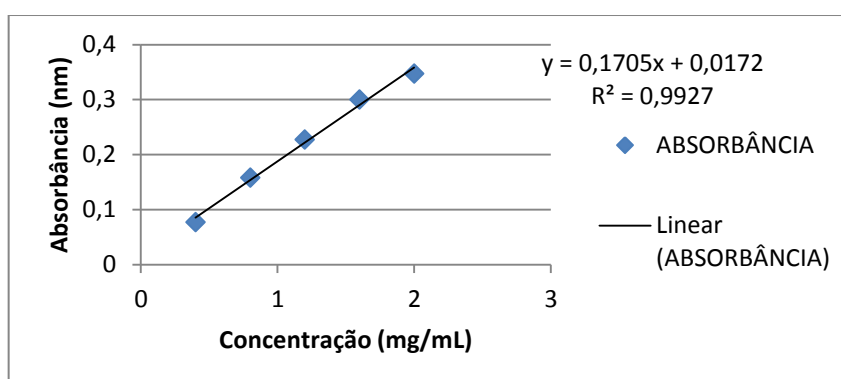


Fonte: Elaborada pela autora.

4.4 Conteúdo de polifenóis totais (PET)

O conteúdo de fenólicos totais dos extratos foi determinado de acordo com o procedimento de Folin-Ciocalteu com modificações (SINGLETON; ROSSI, 1965). Água destilada (3 mL) foi misturada a 0,1 mL de cada extrato em um tubo de ensaio, então 0,25 mL do reagente Folin-Ciocalteu foi adicionado e os tubos foram vigorosamente agitados em um Vortex (Kasvi basic). Após 3 min, 2 mL de carbonato de sódio (20% m/v) foi acrescentado. As amostras foram novamente agitadas e permaneceram por 30 min ao abrigo da luz. A absorbância foi medida a 765 nm utilizando um espectrofotômetro UV-visível (Evolution 60S) e os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama de semente. A quantificação de fenóis totais foi calculada pela interpolação das absorbâncias das amostras em função de uma curva analítica de calibração de ácido gálico em concentrações nos intervalos de 0,4 a 2 mg/mL para a obtenção do gráfico que se encontra na Figura 7. Os extratos foram ainda diluídos quando o valor da absorbância medida estava acima do intervalo linear da curva padrão. Foi realizado o teste em branco com água destilada. Cada amostra foi medida em triplicata.

Figura 7 – Curva analítica de calibração do padrão ácido gálico para quantificação de fenóis totais pelo ensaio com o reagente Folin-Ciocalteu



Fonte: elaborada pela autora.

4.5 Preparo dos meios de cultura

A escolha do meio de cultura BAM (*Bacillus acidocaldarius* medium) foi baseada no catálogo emitido da Coleção de Culturas Tropicais da Fundação André Tosello e em trabalhos realizados anteriormente (BEVILACQUA; CORBO, 2011; MCKNIGHT *et al.*, 2010; WANG; HU; WANG, 2010). A formulação do meio está apresentada na Tabela 2,

conforme o descrito por Darland e Brock (1971). O meio BAM foi utilizado para a manutenção, preparo e contagem de *A. acidoterrestris*, bem como em testes com agentes antibacterianos.

Tabela 2 – Composição do meio de cultura BAM (DARLAND; BROCK, 1971)

Solução A:

Componentes	Quantidades
Extrato de levedura	1,0 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,2 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,5 g
CaCL ₂ . 2H ₂ O	0,25 g
KH ₂ PO ₄	0,6 g
Água destilada	500 mL
O pH foi ajustado para 3,7	

Solução B:

Componentes	Quantidades
Glicose	1,0 g
Ágar	20,0 g
Água destilada	500 mL

Fonte: Adaptada de Darland e Brock, 1971.

A. acidoterrestris é capaz de crescer em valores de pH variando de 2,5 a 6,0 e temperaturas de 25 a 80 °C (WANG; HU; WANG, 2010), no entanto seu pH ótimo fica na faixa de 3 a 4 e a temperatura em torno de 45 °C, dessa forma o pH do meio foi ajustado para 3,7 com H₂SO₄ 0,1N (ALBERICE *et al.*, 2012).

As soluções A e B foram esterilizadas separadamente a 121 °C por 15 minutos. Após o resfriamento, em torno de 50 °C, as soluções foram misturadas em um frasco, em uma cabine de biossegurança e distribuídas em placas de Petri.

Para os testes com *A. acidoterrestris* o ágar Mueller-Hinton (MHA) teve o seu pH modificado de forma a favorecer o crescimento desse microrganismo. Para isso o MHA foi produzido conforme descrito na embalagem pelo fabricante. Após ser autoclavado a 121 °C por 15 min e resfriado a temperatura aproximada de 50 °C foi acidificado com ácido tartárico

a 10% seguindo a metodologia para acidificação do ágar batata dextrose (PDA), adicionando 1 mL de ácido tartárico para 100 mL de meio (SILVA *et al.*, 2010). O pH do meio foi verificado após o resfriamento (pH \approx 3,9). O ágar Mueller-Hinton acidificado (MHAa) teve sua eficiência comparada ao BAM nos ensaios antimicrobianos.

O ágar Mueller-Hinton foi enriquecido com extrato de levedura (YE) para favorecer o crescimento de *L. monocytogenes* e ser utilizado nos ensaios com antimicrobianos. O preparo do meio se deu como o descrito na metodologia para o TSA-YE, o qual é preparado adicionando 0,6% de extrato de levedura ao meio antes da esterilização (SILVA *et al.*, 2010). O desenvolvimento da bactéria no meio MHA-YE pôde ser comparado ao TSA-YE.

4.6 Ensaio de atividade antibacteriana

O estudo da atividade antibacteriana dos extratos aquoso, hexânico e etanólico de sementes de *Moringa oleifera* trituradas e peneiradas foi realizado seguindo-se os métodos recomendados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) para testes de sensibilidade por difusão em disco, com modificações (CLSI, 2005).

4.6.1 Cepas bacterianas

A atividade antibacteriana de extratos de sementes de *M. oleifera*, que foram obtidos pela extração com diferentes solventes, foi avaliada contra as bactérias Gram-positivas *Alicyclobacillus acidoterrestris* CCT 4384 DSM 2498 (Coleção de Culturas Tropical da Fundação André Tosello), *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 (American Type Culture Collection) e *Staphylococcus aureus* ATCC 27664 e as Gram-negativas *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella* Enteritidis IAL 1132 (Instituto Adolfo Lutz) e *Pseudomonas aeruginosa* IAL 1026.

4.6.2 Preparo e padronização dos inóculos

As cepas, que estavam mantidas sob refrigeração (4 °C) em ágar inclinado, foram transferidas para tubos contendo 5 mL de caldo de enriquecimento estéril com o auxílio de alças descartáveis. Os caldos utilizados foram BAM para *A. acidoterrestris*, TSB para *L. monocytogenes* e BHI para o restante dos microrganismos (TABELA 3). As culturas contendo

A. acidoterrestris foram incubadas a 45 °C por 24 h (JOVETTA *et al.*, 2011) e aquelas contendo as demais cepas, a 35 °C por 24 h.

Após o período de incubação, foi feito o isolamento de colônias através do método de estrias de esgotamento em placas contendo os meios de cultura BAM para *A. acidoterrestris*, TSA-YE para *L. monocytogenes* e TSA para os demais microrganismos. Os inóculos também foram estriados em placas contendo seus respectivos meios de cultura para confirmação das colônias (TABELA 3). As placas com *A. acidoterrestris* foram incubadas a 45 °C por 24 h e as outras a 35 °C por 24 h. Após a seleção das colônias isoladas (4 de *A. acidoterrestris* e uma das demais), essas foram transferidas para tubos que continham 5 mL de seus respectivos caldos de enriquecimento. As condições de incubação foram as mesmas já mencionadas.

Tabela 3 – Meios de cultura empregados nas etapas de isolamento e confirmação das bactérias em estudo

Bactérias	ágar (isolamento)	ágar (confirmação)	Caldo
<i>A. acidoterrestris</i>	BAM	BAM	BAM
<i>L. monocytogenes</i>	TSA-YE	PALCAM	TSB
<i>S. aureus</i>	TSA	BP	BHI
<i>E. coli</i>	TSA	MAC	BHI
<i>P. aeruginosa</i>	TSA	PAB	BHI
<i>S. Enteritidis</i>	TSA	HE	BHI

Fonte: Elaborada pela autora.

Realizou-se, então, o ajuste da concentração do inóculo a fim de se obter uma concentração final de 10⁶ UFC/mL (*A. acidoterrestris*) e 10⁸ UFC/mL para as demais bactérias. Todas as suspensões bacterianas foram diluídas em BHI, com exceção da suspensão de *A. acidoterrestris* que não necessitou de diluição (ITURRIAGA; OLABARRIETA; DE MARAÑÓN, 2012). Estas foram então utilizadas como inóculos no teste antimicrobiano. As concentrações dos inóculos foram confirmadas em cada ensaio pelo método de contagem em placa.

4.6.3 Preparo de diluições dos extratos

Os extratos produzidos foram diluídos a 50%, 25%, 12,50%, 6,25%, 3,12%,

1,60%, 0,78% e 0,39% para utilização nos ensaios de atividade antibacteriana.

O extrato aquoso foi diluído em água destilada esterilizada e o extrato hexânico em tween 20 a 20%, ambos nas proporções mencionadas. O extrato etanólico foi diluído em dois diferentes solventes (DMSO a 8% e álcool etílico PA) a fim de se determinar aquele que proporciona uma melhor solubilidade e difusão desse composto em ágar.

4.6.4 Estudo *in vitro* da atividade antibacteriana dos extratos de moringa (*M. oleifera*) – Método de difusão em ágar

A avaliação entre os extratos produzidos com as sementes colhidas no primeiro semestre (M1) e os extratos produzidos com sementes colhidas no segundo semestre (M2) foi realizada para selecionar os extratos com melhor ação antibacteriana a fim de determinar sua concentração inibitória mínima (CIM). Também foram feitas comparações entre dois meios de cultura (BAM e MHAa) no ensaio com o microrganismo *A. acidoterrestris*. Compararam-se também os diluentes do extrato etanólico (EE) com adição de etanol e DMSO para o ensaio de determinação da CIM.

As suspensões bacterianas, nas concentrações anteriormente citadas, foram inoculadas em placas de ágar Mueller-Hinton espalhando-se uniformemente na superfície do ágar com um swab. Para favorecer o crescimento de *A. acidoterrestris*, o meio foi acidificado a pH 4,9 (MHAa) e para o crescimento de *L. monocytogenes* o meio foi acrescido de extrato de levedura (TABELA 4).

Tabela 4 – Meios de cultura utilizados para cada bactéria no método de difusão em ágar

Bactérias	Meios de cultura
<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	MHA acidificado (MHa) e BAM
<i>Listeria monocytogenes</i>	MHA + YE
<i>Staphylococcus aureus</i>	MHA
<i>Escherichia coli</i>	MHA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MHA
<i>Salmonella Enteritidis</i>	MHA

BAM (Bacillus acidocaldarius medium); MHA (ágar Muller-Hinton); MHAa (ágar Muller-Hinton acidificado); MHA – YE (ágar Muller-Hinton + extrato de levedura)

Fonte: Elaborada pela autora.

A superfície do ágar foi então perfurada com furos de 6 mm de diâmetro, os quais

foram preenchidos com 25µL dos extratos de *M. oleifera* (OLIVEIRA *et al.*, 2013). As placas contendo *L. monocytogenes*, *S. Enteritidis*, *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* foram incubadas a 37°C por 24h (KIM *et al.*, 2011; MEDINA *et al.*, 2011; FARJANA; ZERIN; KABIR, 2014), enquanto que as placas inoculadas com *A. acidoterrestris* foram incubadas a 45°C por 24 - 48h (ALBERICE *et al.*, 2012). Após a incubação, foi realizada a medição dos halos de inibição. O diâmetro da zona de inibição em torno do poço (incluindo o do poço) foi medido, com o auxílio de uma régua, e registrado. As zonas com diâmetro maior ou igual a 9 mm foram consideradas como inibição (OLIVEIRA *et al.*, 2013; ZHAO; SHAH, 2015).

4.7 Concentração inibitória mínima (CIM)

A determinação da CIM foi feita através do método de difusão em ágar conforme o descrito por Arora e Onsare (2014); Iturriaga, Olabarrieta e De Marañón (2012); Medina *et al.* (2011) e Takahashi *et al.* (2013) com modificações.

No ensaio anterior foram feitas comparações da ação dos extratos produzidos com as sementes M1 e M2 nas concentrações 100% e 50%. Os que obtiveram melhores resultados foram utilizados em testes posteriores nas concentrações 100%; 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,12%; 1,6%; 0,78% e 0,39% (ATIENO *et al.*, 2011; MEDINA *et al.*, 2011). Os diluentes de cada extrato foram utilizados como controle negativo, sendo os mesmos testados nas mesmas concentrações em que foram utilizados no teste antimicrobiano.

A concentração inibitória mínima (CIM) foi considerada a menor concentração do extrato que inibiu o crescimento microbiano após o período de incubação (ITURRIAGA; OLABARRIETA; DE MARAÑÓN, 2012). Todos os testes foram feitos em triplicata.

4.8 Análise estatística

O estudo dos ensaios estatísticos foi realizado de acordo com Boulaaba *et al.* (2015). Para tanto, utilizou-se a Microsoft Office 2007 (Excel) para realizar os cálculos da variância.

Os ensaios de triagem da atividade antibacteriana sobre *A. acidoterrestris* foram realizados em dois meios de cultura BAM e MHAA com diferentes concentrações dos extratos naturais. Os dados foram avaliados para determinar se o meio de cultura exerce influência nos resultados, já que o MHAA é uma adaptação, onde acidificou-se o meio para favorecer o crescimento desse microrganismo acidófilo. Para tanto, utilizou-se o cálculo de variância com

confiabilidade de 95%.

Com o auxílio da ferramenta estatística do Excel (Microsoft) aplicou-se o teste da hipótese nula, onde o valor de F calculado foi comparado com o valor de F tabelado. Se o valor de F calculado for maior que o F tabelado ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$) rejeita a hipótese nula, concluindo que o meio de cultura é significativo. Se $F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$, o meio de cultura não apresenta influência no resultado.

Os resultados do conteúdo de fenóis totais dos extratos de *M. oleifera* também foram avaliados para se determinar se o período em que as sementes foram coletadas exerce influência no resultado. Para essa análise usou-se o teste do valor- p , com nível de confiança de 95%, ou seja, valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. As análises foram realizadas em triplicata.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Conteúdo de polifenóis totais (PET)

Os valores da determinação de compostos fenólicos totais encontrados nos extratos das sementes de moringa (EAM1, EAM2, EHM1, EHM2, EEM1 e EEM2) estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5 – Quantificação do conteúdo de polifenóis extraíveis totais dos extratos da semente de *Moringa oleifera*

Extrato	Fenóis totais (mg EAG/g de semente)
EAM1	3,84 ± 0,15
EAM2	8,56 ± 0,52
EHM1	3,51 ± 0,31
EHM2	4,97 ± 0,36
EEM1	241,76 ± 15,88
EEM2	56,47 ± 5,76

Fonte: Elaborado pela autora.

Valor- p dos extratos EAM1 e EAM2 = 0,000; Valor- p dos extratos EHM1 e EHM2 = 0,004; Valor- p dos extratos EEM1 e EEM2 = 0,002.

EAM1 – extrato aquoso produzido com as sementes colhidas no primeiro semestre do ano; EAM2 – extrato aquoso produzido com as sementes colhidas no segundo semestre do ano; EHM1 – extrato hexânico produzido com as sementes colhidas no primeiro semestre do ano; EHM2 – extrato hexânico produzido com as sementes colhidas no segundo semestre do ano; EEM1 – extrato etanólico produzido com as sementes colhidas no primeiro semestre do ano; EEM2 – extrato etanólico produzido com as sementes colhidas no segundo semestre do ano.

Uma vez que os extratos foram produzidos com sementes de moringa colhidas em diferentes épocas do ano comparou-se, pela análise de variância, o conteúdo de fenóis totais presentes nos extratos produzidos com o mesmo solvente, mas de sementes de moringa colhidas no primeiro semestre (M1) e no segundo semestre (M2). Diferenças significativas ($p < 0,05$) no conteúdo de polifenóis extraíveis totais (PET) foram observadas entre os extratos aquosos (EAM1 e EAM2), hexânicos (EHM1 e EHM2) e etanólicos (EEM1 e EEM2) (TABELA 5), mostrando que o período de colheita das sementes influencia significativamente na concentração dos compostos fenólicos. No entanto, o extrato etanólico não segue o comportamento dos outros dois, já que o maior conteúdo de fenóis foi observado no extrato produzido com sementes M1, enquanto nos extratos aquoso e hexânico a maior concentração está naqueles produzidos com as sementes M2.

O extrato etanólico produzido com sementes colhidas no primeiro semestre do ano (EEM1) apresentou um elevado valor de PET ($241,76 \pm 15,88$ mg EAG/g de semente), enquanto o extrato hexânico (EHM1) mostrou obter um conteúdo de polifenóis extraíveis totais inferior com $3,51 \pm 0,31$ mg EAG/g de semente. O extrato aquoso (EAM2) apresentou um PET com valor intermediário igual a $8,56 \pm 0,52$ mg EAG/g de semente. No entanto, o conteúdo de PET dos extratos produzidos com diferentes solventes não pode ser comparado entre si, visto que para a produção dos extratos utilizaram-se diferentes metodologias.

Em um estudo sobre a avaliação do potencial antioxidante de extratos etanólicos de sementes de *M. oleifera* o conteúdo de fenóis totais extraíveis no extrato etanólico das sementes de moringa foi igual a $8,06 \pm 0,47$ mg EAG/g de extrato (NASCIMENTO *et al.*, 2013). Hamza (2010) avaliou o conteúdo total de fenólicos de extrato etanólico de sementes de *M. oleifera* e determinou uma quantidade de $10,60 \pm 0,11$ mg EAG/g de extrato seco. O presente estudo apresentou valores de PET superiores aos apresentados nos trabalhos citados em ambos os extratos etanólicos (EEM1 e EEM2) com $241,76 \pm 15,88$ e $56,47 \pm 5,76$ mg EAG/g de semente, respectivamente. Compaoré *et al.* (2011) avaliaram a composição química e propriedades antioxidantes de sementes de *Moringa oleifera* e determinaram um teor de polifenóis totais de $145,16 \pm 0,1$ mg/100g. Extraíndo-se os compostos fenólicos com metanol, Govardhan Singh, Negi e Radha (2013) encontraram um conteúdo de fenólicos totais livres em farinha de semente de *M. oleifera* desengordurada igual a 780 mg EAG/100g de extrato. O efeito da temperatura durante a germinação das sementes de moringa foi avaliado por Tesfay, Modi e Mohammed (2016) e percebeu-se que as temperaturas investigadas afetaram significativamente o acúmulo de fenóis nas sementes durante a germinação, variando de $69 \pm 2,9$ mg/100g a $122,5 \pm 10$ mg/100g, nas temperaturas de 20/10 °C e 30/20 °C,

respectivamente.

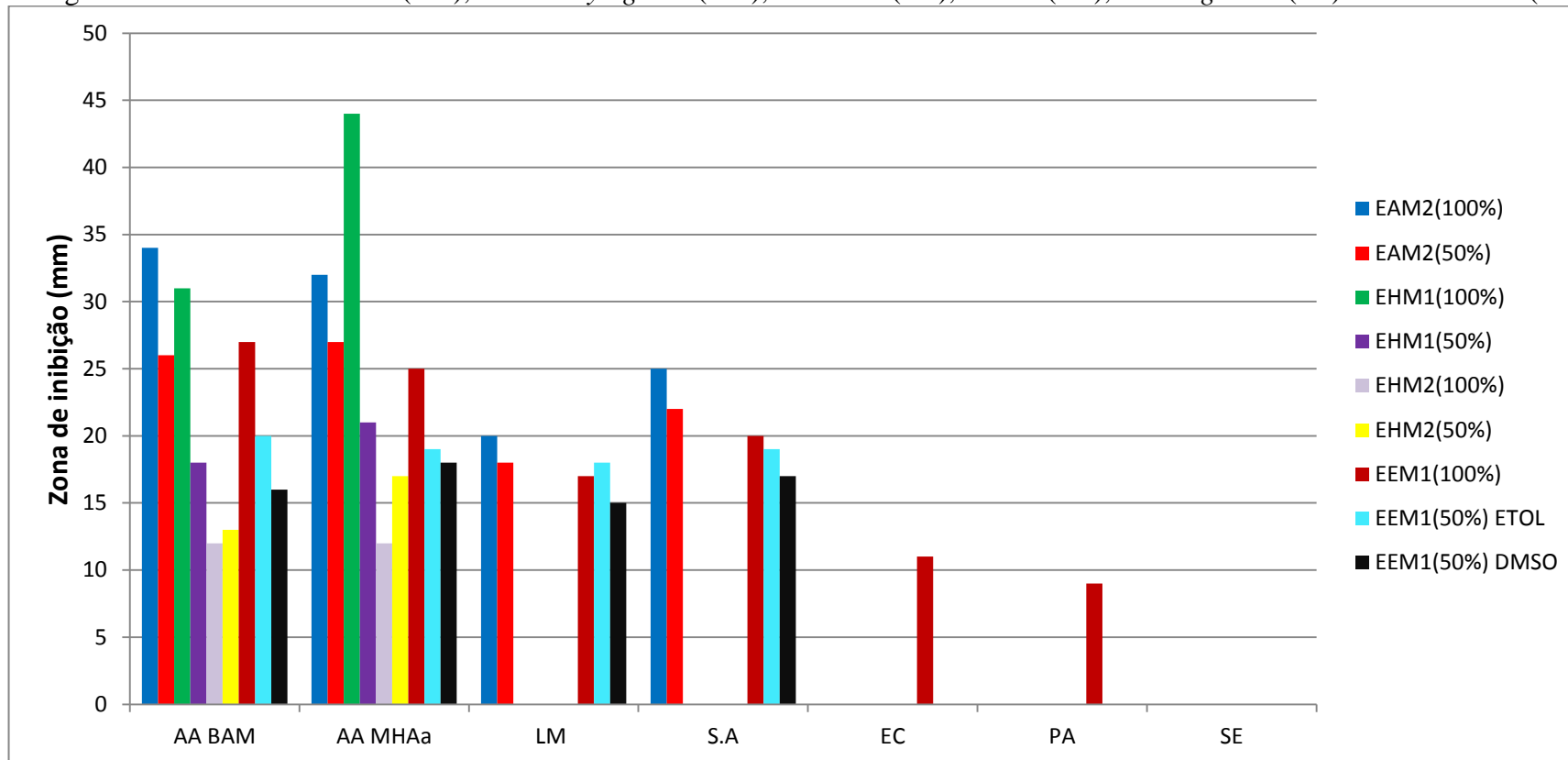
5.2 Atividade antibacteriana

Os resultados das avaliações para identificar entre os extratos aquosos, hexânicos e etanólicos aqueles que possuem alguma atividade antibacteriana sobre as bactérias em estudo, são apresentados no Gráfico 1. Os testes mostraram que há diferença na ação antibacteriana dos extratos produzidos com sementes de *Moringa oleifera* colhidas em diferentes épocas do ano. Pode-se observar que o extrato aquoso produzido com sementes colhidas no primeiro semestre do ano (EAM1) não apresentou efeito antibacteriano sobre nenhum dos microrganismos testados, enquanto o extrato produzido com sementes obtidas no segundo semestre (EAM2) mostrou uma boa atividade sobre o crescimento de *A. acidoterrestris*, *L. monocytogenes* e *S. aureus*. O microrganismo *A. acidoterrestris* se mostrou sensível aos efeitos de ambos os extratos hexânico (EHM1 e EHM2), entretanto todas as outras bactérias testadas foram resistentes a estes extratos. Ao contrário do observado nos extratos aquosos, o extrato etanólico produzido com sementes colhidas no primeiro semestre (EEM1) teve ação antibacteriana contra *A. acidoterrestris*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* e um menor efeito sobre *E. coli* e *P. aeruginosa*, sendo que o extrato produzido com sementes colhidas no segundo semestre (EEM2) não mostrou qualquer efeito sobre nenhuma das bactérias.

A atividade antibacteriana dos extratos de sementes de moringa pode estar relacionada ao seu conteúdo de compostos fenólicos. Alguns autores sugerem que esses compostos podem interagir com as proteínas da membrana celular das bactérias, causando danos à integridade da membrana celular com consequente liberação do citoplasma ou podem estar envolvidos na interação com enzimas celulares (ALANÓN *et al.*, 2015).

Comparando-se os resultados das avaliações da atividade antibacteriana dos extratos das sementes de moringa, descritos no apêndice A, com o conteúdo de polifenóis extraíveis totais (Tabela 5) observa-se uma relação direta em ambos os resultados para todos os extratos. O extrato aquoso produzido com sementes colhidas no primeiro semestre (EAM1)

Gráfico 1 – Resultado das avaliações da atividade antibacteriana de extratos de sementes de *Moringa oleifera* pelo método de difusão em ágar contra *A. acidoterrestris* (AA), *L. monocytogenes* (LM), *S. aureus* (SA), *E. coli* (EC), *P. aeruginosa* (PA) e *S. Enteritidis* (SE)



Fonte: Elaborado pela autora.

EAM2 100% (extrato aquoso das sementes M2 puro); EAM2 50% (extrato aquoso das sementes M2 diluído com 50% de água); EHM1 100% (extrato hexânico das sementes M1 puro); EHM1 50% (extrato hexânico das sementes M1 diluído com 50% de tween 20 a 20%); EHM2 100% (extrato hexânico das sementes M2 puro); EHM2 50% (extrato hexânico das sementes M2 diluído com 50% de tween 20 a 20%); EEM1 100% (extrato etanólico das sementes M1 puro); EEM1 50% Etol (extrato etanólico das sementes M1 diluído em 50% de álcool etílico); EEM1 50% DMSO (extrato etanólico das sementes M1 diluído em 50% de DMSO a 8%).

apresentou um menor conteúdo de fenóis ($3,84 \pm 0,15$ mg EAG/g de semente) quando comparado ao EAM2, que obteve um resultado de $8,56 \pm 0,52$ mg EAG/g de semente apresentando, conseqüentemente, uma significativa atividade antibacteriana sobre as três bactérias Gram positivas avaliadas. No Gráfico 1 observa-se que os extratos hexânicos obtidos nas duas épocas do ano (EHM1 e EHM2) mostraram atividade antibacteriana semelhante contra a bactéria *A. acidoterrestris*, enquanto os valores encontrados de fenóis totais foram bem próximos: $3,51 \pm 0,31$ e $4,97 \pm 0,36$ mg EAG/g de semente, respectivamente. O extrato etanólico também mostrou relação direta da atividade antibacteriana com o conteúdo de fenóis totais, pois o extrato produzido com sementes colhidas no primeiro semestre (EEM1) apresentou um quantitativo de fenóis igual a $241,76 \pm 15,88$ mg EAG/g de semente e teve atividade antibacteriana contra quase todas as bactérias em estudo. Enquanto aquele produzido com sementes colhidas no segundo semestre (EEM2) não mostrou atividade sobre nenhuma das bactérias e obteve um resultado de fenóis totais inferior ($56,47 \pm 5,76$ mg EAG/g de semente).

Analisando-se os dados dos extratos produzidos com diferentes solventes observa-se que a atividade antibacteriana pode não estar relacionada apenas ao conteúdo de polifenóis totais, mas também ao composto fenólico predominante. Visto que o extrato EAM2 ($8,56 \pm 0,52$ mg EAG/g de semente) apresentou atividade antibacteriana sobre algumas das bactérias em análise, enquanto o extrato EEM2, que obteve conteúdo de polifenóis igual a $56,47 \pm 5,76$ mg EAG/g de semente, não apresentou nenhuma atividade contra as bactérias em estudo.

Alguns estudos já mostraram a relação entre o solvente utilizado no processo de extração com a capacidade de extração de compostos fenólicos e o conseqüente efeito sobre a bioatividade dos extratos (RUSAK *et al.*, 2008; ZHAO; HALL III, 2008). Pode-se afirmar que normalmente existe uma correlação positiva entre os compostos fenólicos presentes nos extratos naturais e o efeito antibacteriano. O mecanismo para a atividade antibacteriana de muitos extratos de plantas tem sido atribuído aos compostos fenólicos, os quais podem interagir com a membrana celular e inativar enzimas essenciais e/ou que formam complexos com íons metálicos, o que reduz sua disponibilidade para atuar no metabolismo microbiano (CAILLET *et al.*, 2007; GOVARDHAN SINGH; NEGI; RADHA, 2013).

Pesquisadores relataram variações do conteúdo de alguns compostos em diferentes partes da *M. oleifera*. Anwar, Ashraf e Bhangar (2005) fizeram comparações da composição química do óleo das sementes de *M. oleifera* de diferentes regiões agroclimáticas e observaram variações em seus componentes. O teor de óleo extraído também oscilou significativamente e os autores atribuíram essa variação à diversidade na textura natural do

solo e a restrições climáticas. Outras pesquisas também mostraram que a localização agroclimática e o período de colheita, bem como a temperatura ambiente têm bastante efeito sobre a atividade antioxidante das folhas de *M. oleifera*, apresentando alterações no conteúdo de fenólicos totais e de flavonoides. Os autores sugeriram que isto pode ser devido ao grau de maturação da folha, relatando um aumento do conteúdo de fenólicos com a maturidade da folha (IQBAL; BHANGER, 2006).

Em um estudo mais recente Ratshilivha *et al.* (2014) avaliaram a variação da atividade antibacteriana e antioxidante de 24 extratos de folhas extraídos com o solvente acetona na proporção 1:10 (m/v) colhidas no verão e no inverno em 12 árvores de *M. oleifera* e observaram uma variação em ambas as atividades dos extratos.

Os resultados contidos no Gráfico 1 também mostram que os microrganismos Gram-negativos (*E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. Enteritidis*) apresentaram uma maior resistência à ação dos extratos de *M. oleifera*, enquanto que os Gram-positivos (*A. acidoterrestris*, *L. monocytogenes* e *S. aureus*) mostraram uma maior sensibilidade a esses compostos. Estes resultados estão de acordo com ensaios antimicrobianos anteriormente relatados utilizando extratos de folhas, sementes e flores de *M. oleifera* (NEPOLEAN; ANITHA; RENITTA, 2009); de folhas e sementes de *M. oleifera* (BUKAR; UBA; OYEYI, 2010); extratos de 12 plantas (*Terminalia chebula* Retz., *Sophora flavescens* Ait., *Hydnocarpus anthelmintica*, *Rosmarinus officinalis*, *Cannabis sativa*, *Commiphora molmol*, *Morus alba* L., *Agrimonia pilosa* L., *Asarum sieboldii*, *Pinus densiflora*, *Syzygium aromaticum* e *Thuja orientalis* L.) (KIM *et al.*, 2011); extratos de salsa (*Petroselinum sativum*) e limão (*Citrus limon*) (ITURRIAGA; OLABARRIETA; DE MARAÑÓN, 2012); bagaço de uva (OLIVEIRA *et al.*, 2013); extratos de caule, folhas vagens e sementes de *M. oleifera* (BRILHANTE *et al.*, 2015) e extratos de chá verde, chá preto e soja (ZHAO; SHAH, 2015), os quais mostram que, no geral, as bactérias Gram-positivas são mais sensíveis a esses compostos antibacterianos do que as Gram-negativas. No entanto, alguns autores determinaram atividade antibacteriana dos extratos de folhas, flores e vagens de *M. oleifera* contra as bactérias Gram-negativas (ANWAR *et al.*, 2007; ARORA; ONSARE, 2014).

A maior resistência das bactérias Gram-negativas está provavelmente relacionada com a sua dupla camada da membrana celular e à forte hidrofobicidade da membrana externa atuando como uma forte barreira que limita o acesso do agente antimicrobiano aos seus alvos na célula bacteriana. Em contrapartida, a única membrana das bactérias Gram-positivas facilita a penetração de compostos lipofílicos (SMITH-PALMER; STEWART; FYFE, 1998; STEFANELLO *et al.*, 2008; ARORA; ONSARE, 2014).

Molva e Baysal (2015a) avaliaram a atividade antimicrobiana de extrato líquido comercial derivado da semente de uva contra células vegetativas e esporos de *A. acidoterrestris* em suco de maçã. Os resultados do estudo demonstraram que o extrato de sementes de uva tem um potencial efeito inibitório no crescimento de células e na germinação de esporos de *A. acidoterrestris* em suco de maçã, sendo esse efeito relacionado ao alto teor de fenóis totais que as sementes de uva apresentam.

P. aeruginosa, apesar de ser uma bactéria Gram-negativa, apresentou sensibilidade ao extrato etanólico, apresentando um halo de 9 mm (GRÁFICO 1). No trabalho realizado por Oliveira *et al.* (2013), *P. aeruginosa* também teve relativa sensibilidade a um extrato de bagaço de uva obtido por extração com fluido supercrítico, formando um halo de diâmetro igual a 10 mm. Essa bactéria mostrou uma elevada sensibilidade (halo de 14 ± 2 mm) ao extrato de *Azadirachta indica* na concentração de 500 mg/mL (ABALAKA; OYEWOLE; KOLAWOLE, 2012).

A atividade antimicrobiana de extratos de chá verde, chá preto e soja foi avaliada sobre *E. coli* O157:H7, *Cronobacter sakazakii*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *Lactobacillus plantarum*. Os resultados obtidos da ação dos extratos brutos sobre *S. aureus* e *L. monocytogenes* corroboram com o apresentado neste trabalho, observando-se resultados positivos da ação dos extratos sobre o crescimento destas bactérias (ZHAO; SHAH, 2015).

Medina *et al.* (2011) mostraram atividade antibacteriana de extratos de araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) contra *S. Enteritidis* através do método de difusão em disco e encontraram uma concentração inibitória mínima de 5%. No entanto, nenhum efeito foi detectado no presente estudo com extratos das sementes de moringa.

Foi realizada a comparação da influência dos meios de cultura BAM e MHAa utilizados no ensaio com *A. acidoterrestris* através da análise da variância (ANOVA) pelo teste F, para um nível de confiança de 95%. Os resultados estatísticos estão descritos na Tabela 6. Verificou-se que a diferença entre os diâmetros dos halos formados nos dois meios de cultura não foi significativa, pois o valor determinado do teste F (0,2323) foi menor que o valor de F crítico (tabelado). O tamanho do halo de inibição é o resultado combinado da difusão dos compostos antimicrobianos e a taxa de crescimento da bactéria (ZHAO; SHAH, 2015).

Tabela 6 – Valores da análise de variância (ANOVA)

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	18	1	18	0,2323	0,636351	4,493998
Dentro dos grupos	1239,778	16	77,48611			
Total	1257,778	17				

SQ: soma quadrática; gl: grau de liberdade; MQ: média quadrática

Fonte: Elaborada pela autora.

O estudo também foi realizado com o objetivo de definir o solvente a ser utilizado para a diluição do extrato etanólico. Dessa forma pôde-se observar (APÊNDICE A) que o extrato etanólico diluído em etanol (EEM1 50% etol) teve uma melhor difusão nos meios de cultura, portanto foi o solvente escolhido para diluir o extrato nos ensaios de determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

Nos ensaios todos os diluentes foram utilizados como controle negativo, não apresentando qualquer efeito sobre o crescimento dos microrganismos testados (APÊNDICE D – I).

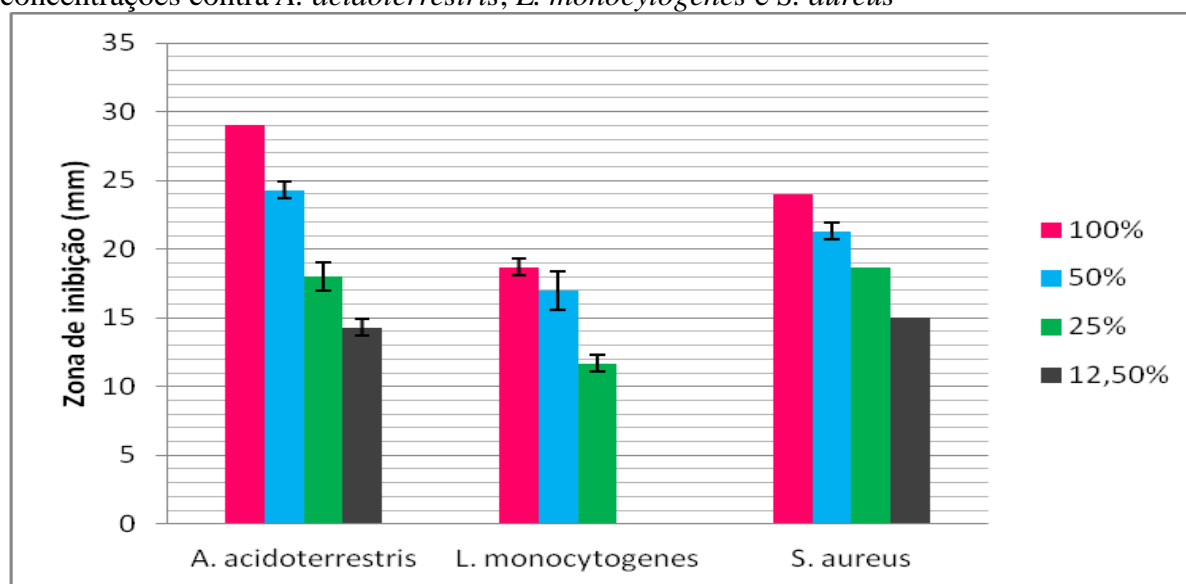
5.3 Concentração inibitória mínima (CIM)

Após a triagem foram escolhidos os extratos que apresentaram melhor ação como agente antibacteriano contra as bactérias testadas, selecionando-se também as bactérias que se mostraram mais sensíveis a esses compostos para os ensaios de concentração inibitória mínima. Os extratos escolhidos foram o aquoso (EAM2) e o etanólico (EEM1) e os microrganismos que se mostraram mais sensíveis a esses extratos foram as bactérias Gram-positivas (*A. acidoterrestris*, *L. monocytogenes* e *S. aureus*), como já discutido no item 5.2.

No Gráfico 2 observa-se a atividade antibacteriana do extrato aquoso em diferentes concentrações. Os halos de inibição (mm) do extrato aquoso nas concentrações de 100 a 0,39% estão descritos no apêndice B. Pode-se verificar que a bactéria *A. acidoterrestris* foi a mais sensível nas concentrações 100 % e 50% (29,0 e 24,3 mm, respectivamente) e *S. aureus* foi ligeiramente mais sensível nas concentrações 25 e 12,5% (18,7 e 15 mm, respectivamente), enquanto que a *L. monocytogenes* se mostrou mais resistente em todas as concentrações do extrato quando comparada aos outros dois microrganismos.

A menor concentração do extrato aquoso que teve ação sobre *A. acidoterrestris* e *S. aureus* foi 12,5%, formando-se um halo de 14,3 e 15 mm, respectivamente. A bactéria *L. monocytogenes* teve sensibilidade ao extrato até a concentração de 25%, com halo de 11,7 mm.

Gráfico 2 – Avaliação da atividade antibacteriana do extrato aquoso em diferentes concentrações contra *A. acidoterrestris*, *L. monocytogenes* e *S. aureus*

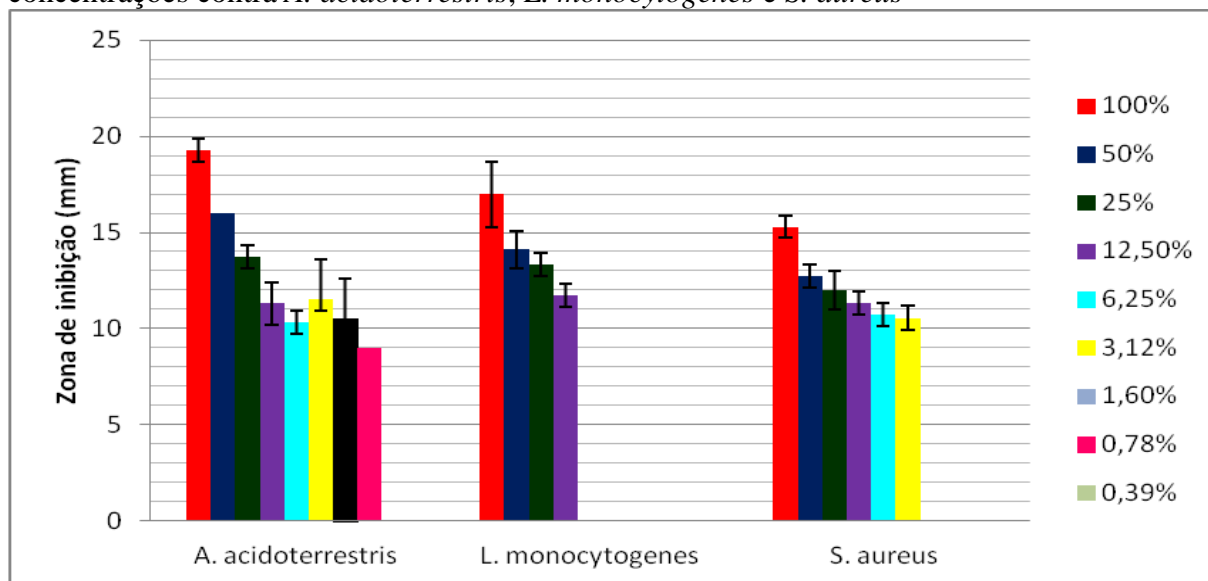


Fonte: Elaborado pela autora.

Os extratos solúveis em água, quando comparados a outros compostos naturais como, por exemplo, os óleos essenciais, podem ser preferíveis para aplicação em alimentos. Apesar de, geralmente, os óleos essenciais serem mais ativos que os seus correspondentes extratos solúveis em água, eles são também voláteis e fracamente solúveis em água, o que pode ser bastante desvantajoso para a sua incorporação em alimentos (ITURRIAGA; OLABARRIETA; DE MARAÑÓN, 2012).

No Gráfico 3 pode-se verificar a ação antibacteriana do extrato etanólico sobre as bactérias *A. acidoterrestris*, *L. monocytogenes* e *S. aureus*. Dessa forma, observa-se que o microrganismo mais sensível a diferentes concentrações do extrato etanólico foi o *A. acidoterrestris*, apresentando-se uma CIM de 0,78%, com halo de 9 mm. O segundo mais sensível foi *S. aureus* com CIM no valor de 3,12%, obtendo-se um halo de 10,5 mm. Assim como o observado no extrato aquoso, a bactéria mais resistente foi *L. monocytogenes*, onde se obteve como CIM a concentração de 12,5%, medindo-se um halo de 11,7 mm (APÊNCICE C).

Gráfico 3 – Avaliação da atividade antibacteriana do extrato etanólico em diferentes concentrações contra *A. acidoterrestris*, *L. monocytogenes* e *S. aureus*



Fonte: elaborado pela autora.

Nota-se em ambos os gráficos que houve um decréscimo do diâmetro do halo de inibição com o aumento da diluição dos extratos, apesar de ter ocorrido uma pequena variação, entre as concentrações 6,25 e 0,78%, nos halos formados pela ação do extrato etanólico contra *A. acidoterrestris*.

Os valores da CIM obtidos pelos extratos aquoso e etanólico não podem ser comparados, já que ambos foram produzidos de formas diferentes (FIGURAS 5 e 6). Vale ressaltar que após a extração por solvente o etanol foi totalmente removido, obtendo-se um extrato concentrado, diferente do que ocorreu na produção do extrato aquoso visto que a água não foi removida ao final do processo obtendo-se, portanto, um extrato diluído.

Os resultados podem ser observados nos apêndices J e K, onde estão as imagens das placas utilizadas nos ensaios para determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

O método de difusão em placa, como um teste preliminar necessita de padronização em relação aos microrganismos relacionados a alimentos. Essas metodologias apresentam variações em relação à forma de medição dos halos, subtraindo-se ou não o diâmetro do poço/disco; quantidade da substância avaliada; o meio de cultura utilizado para o teste com cada microrganismo, entre outras, o que impossibilita comparações mais aprofundadas dos resultados.

6 CONCLUSÕES

- A época de colheita das sementes de *M. oleifera* influencia diretamente no potencial antibacteriano dos extratos obtidos, sendo o conteúdo de fenólicos um dos interferentes;
- Os extratos aquoso e etanólico foram os que apresentaram maior ação antimicrobiana sobre os microrganismos analisados;
- As bactérias Gram-positivas se mostraram mais sensíveis à ação antimicrobiana dos extratos;
- A concentração inibitória mínima (CIM) considerada ideal do extrato aquoso é 25%, por ser a menor concentração que apresentou atividade antibacteriana contra *A. acidoterrestris*, *L. monocytogenes* e *S. aureus*;
- A concentração de 12,5% do extrato etanólico foi a menor concentração que mostrou atividade antibacteriana contra os três microrganismos em teste;
- O extrato etanólico de sementes de *Moringa oleifera* apresentou eficiência como antimicrobiano para *A. acidoterrestris* mesmo em concentrações bastante reduzidas, obtendo-se uma MIC de 0,78%;
- O conteúdo de polifenóis totais e o composto fenólico predominante podem ter influenciado na atividade antibacteriana de cada extrato de sementes de moringa.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Este estudo incentiva o aprofundamento das pesquisas sobre a semente de *M. oleifera* para que, futuramente, possa ser possível a sua adição em alimentos com função de conservante e atuação na segurança alimentar;
- Percebe-se a necessidade de realização de novos testes de determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para extrato aquoso de sementes de *M. oleifera* liofilizado;
- Faz-se necessária a investigação do sinergismo da ação antibacteriana dos extratos de *M. oleifera* com outros extratos oriundos de diferentes espécies vegetais, bem como a sua associação aos compostos sintéticos, podendo substituí-los de forma total ou parcial nos produtos alimentícios.
- Deve-se estudar a utilização desses extratos associados à tecnologia de nanoencapsulação, a fim de favorecer a sua ação em determinado tipo de alimento, de forma a, por exemplo, evitar interações indesejáveis com os componentes dos alimentos, através da sua liberação gradual e constante, aumentando o seu tempo de ação; e minimizar/eliminar possíveis alterações sensoriais nos produtos.
- Realizar análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) para avaliar o mecanismo de ação dos extratos na célula microbiana.

REFERÊNCIAS

- ABALAKA, M.; OYEWOLE, O. A.; KOLAWOLE, A. R. Antibacterial activities of *Azadirachta indica* against some bacterial pathogens. **Advances in Life Sciences**, Nigeria, v. 2, p. 5-8, 2012.
- ABDOLLAHZADEH, E.; REZAEI, M.; HOSSEINI, H. Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. **Food Control**, v. 35, n. 1, p. 177-183, 2014.
- ABEW, B.; SAHILE, S.; MOGES, F. In vitro antibacterial activity of leaf extracts of *Zehneria scabra* and *Ricinus communis* against *Escherichia coli* and methicillin resistance *Staphylococcus aureus*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, n. 10, p. 816-820, 2014.
- ALANÓN, M. E. *et al.* Antimicrobial and antioxidant activity of pressurized liquid extracts from oenological woods. **Food Control**, v. 50, p. 581-588, 2015.
- ALBERICE, J. V. *et al.* Inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in orange juice by saponin extracts combined with heat-treatment. **International Journal of Food Microbiology**, v. 159, n. 2, p. 130-135, 2012.
- ALHAKMANI, F.; KUMAR, S.; KHAN, S. A. Estimation of total phenolic content, in-vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of flowers of *Moringa oleifera*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 3, n. 8, p. 623-627, 2013.
- ALLEN, K. J. *et al.* *Listeria monocytogenes* – An examination of food chain factors potentially contributing to antimicrobial resistance. **Food Microbiology**, v. 54, p. 178-189, 2016.
- ANWAR, F.; ASHRAF, M.; BHANGER, M. I. Interprovenance variation in the composition of *Moringa oleifera* oilseeds from Pakistan. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 82, n. 1, p. 45-51, 2005.
- ANWAR, F. *et al.* *Moringa oleifera*: a food plant with multiple medicinal uses. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 1, p. 17-25, 2007.
- ARORA, D. S.; ONSARE, J. G. In vitro antimicrobial evaluation and phytoconstituents of *Moringa oleifera* pod husks. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 125-135, 2014.
- ARORA, D. S.; ONSARE, J. M.; KUAR, H. Bioprospecting of *Moringa* (Moringaceae): Microbiological Perspective. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 1, 2013.
- ATIENO, W. *et al.* Antibacterial activity of *Moringa oleifera* and *Moringa stenopelata* methanol and n-hexane seed extracts on bacteria implicated in water borne diseases. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 2, p. 153-157, 2011.

AUVOLAT, A.; BESSE, N. G. The challenge of enumerating *Listeria monocytogenes* in food. **Food Microbiology**, v. 53, Part B, p. 135-149, 2016.

BAKER, C. A. *et al.* Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in food: Incidence, ecology, and detection strategies. **Food Control**, v. 59, p. 407-419, 2016.

BAUTISTA, D. A. Spoilage problems | Problems Caused by Bacteria A2 - Tortorello, Carl A. BattMary Lou. In: (Ed.). **Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)**. Oxford: Academic Press, p.465-470, 2014.

BERGER, C. N. *et al.* Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. **Environ Microbiol**, v. 12, n. 9, p. 2385-97, Sep. 2010.

BEVILACQUA, A.; CORBO, M. R. Characterization of a wild strain of *Alicyclobacillus acidoterrestris*: heat resistance and implications for tomato juice. **J Food Sci**, n. 1750-3841, Mar. 2011.

BIJINA, B. *et al.* Protease inhibitor from *Moringa oleifera* with potential for use as therapeutic drug and as seafood preservative. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 18, n. 3, p. 273-281, 2011.

BAUMGART, J. Media for the detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Alicyclobacillus acidocaldarius* in foods. Handb. Cult. Media Food Microbiol. Chapter 11. **Elsevier Science B. V.**, 2003.

BOULAABA, M. *et al.* Antimicrobial activities and phytochemical analysis of *Tamarix gallica* extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 1114-1122, 2015.

BRILHANTE, R. S. N. *et al.* *Vibrio* spp. from *Macrobrachium amazonicum* prawn farming are inhibited by *Moringa oleifera* extracts. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 8, n. 11, p. 919-922, 2015.

BUKAR, A.; UBA, A.; OYEYI, T. I. Antimicrobial profile of *Moringa oleifera* Lam. extracts against some food - borne microorganisms. **Bayero Journal of Pure and Applied Sciences: Bajopas**, v. 3, p. 43 – 48, 2010.

CACERES, A. *et al.* Pharmacologic properties of *Moringa oleifera*: Screening for antispasmodic, antiinflammatory and diuretic activity. **J Ethnopharmacol**, v. 36, n. 3, p. 233-7, Jun. 1992.

CAILLET, S. *et al.* Fenton reaction applied for screening natural antioxidants. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 542-552, 2007.

CAREAGA, M. *et al.* Antibacterial activity of *Capsicum* extract against *Salmonella typhimurium* and *Pseudomonas aeruginosa* inoculated in raw beef meat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, n. 3, p. 331-335, 2003.

CARTWRIGHT, E. J. *et al.* Listeriosis Outbreaks and Associated Food Vehicles, United States, 1998–2008. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 1-9, 2013.

- CHEENPRACHA, S. *et al.* Potential anti-inflammatory phenolic glycosides from the medicinal plant *Moringa oleifera* fruits. **Bioorg Med Chem**, v. 18, n. 17, p. 6598-602, Sep. 2010.
- CHEN, X. *et al.* Efficacy of a combination of nisin and p-Anisaldehyde against *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 66, p. 100-106, 2016.
- CHEN, X. *et al.* Ethanol extract of *Sanguisorba officinalis* L. inhibits biofilm formation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an ica-dependent manner. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 12, p. 8486-8491, 2015.
- CIZEIKIENE, D. *et al.* Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against pathogenic and spoilage microorganism isolated from food and their control in wheat bread. **Food Control**, v. 31, n. 2, p. 539-545, 2013.
- CLINICAL and Laboratory Standards Institute (CLSI). **Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão**, 2005.
- COMPAORÉ, W. R. *et al.* Chemical composition and antioxidative properties of seeds of *Moringa oleifera* and pulps of *Parkia biglobosa* and *Adansonia digitata* commonly used in food fortification in Burkina Faso. **Current Research Journal of Biological Sciences**, v. 3, p. 64-72, 2011.
- DARLAND, G.; BROCK, T. D. *Bacillus acidocaldarius* sp. nov., an acidophilic thermophilic spore-forming bacterium. **Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 9-15, 1971.
- DAS, A. K. *et al.* *Moringa oleifera* leaves extract: a natural antioxidant for retarding lipid peroxidation in cooked goat meat patties. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 47, n. 3, p. 585-591, 2012.
- DEBNATH, S. *et al.* *Moringa oleifera* induced potentiation of serotonin release by 5-HT(3) receptors in experimental ulcer model. **Phytomedicine**, v. 18, n. 2-3, p. 91-5, Jan. 2011.
- DOENÇAS Transmitidas por Alimentos, 2016. Disponível em <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/marco/10/Apresenta---o-dados-gerais-DTA-2016.pdf>>. Acesso em: 15 mar. 2016.
- DREVETS, D. A.; BRONZE, M. S. *Listeria monocytogenes*: epidemiology, human disease, and mechanisms of brain invasion. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 53, n. 2, p. 151-65, Jul. 2008.
- ELSAS, J. D. *et al.* Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects. **International Society for Microbial Ecology**, v. 5, p.173-183, 2011.
- FARJANA, A.; ZERIN, N.; KABIR, M. S. Antimicrobial activity of medicinal plant leaf extracts against pathogenic bacteria. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 4, Supplement 2, p. S920-S923, 2014.
- FERNANDES, D. M. *et al.* *Moringa oleifera*: A potential source for production of biodiesel and antioxidant additives. **Fuel**, v. 146, p. 75-80, 2015.

- FERRARIO, M.; ALZAMORA, S. M.; GUERRERO, S. Study of the inactivation of spoilage microorganisms in apple juice by pulsed light and ultrasound. **Food Microbiology**, v. 46, p. 635-642, 2015.
- FERREIRA, R. S. *et al.* Coagulant and antibacterial activities of the water-soluble seed lectin from *Moringa oleifera*. **Lett Appl Microbiol**, v. 53, n. 2, p. 186-92, Aug. 2011.
- FOODBORNE pathogenic microorganisms and natural toxins handbook. Food and Drug Administration (FDA), 2. ed., 2012. Disponível em: < <http://www.fda.gov/Food/FoodborneIllnessContaminants/CausesOfIllnessBadBugBook/>>. Acesso em: 10 set. 2015.
- FU, Z.; ZHOU, X.; XING, D. Rapid colorimetric gene-sensing of food pathogenic bacteria using biomodification-free gold nanoparticle. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 182, p. 633-641, 2013.
- FUNDAÇÃO CEARENSE DE METEOROLOGIA E RECURSOS HÍDRICOS (FUNCEME). **Gráfico de chuvas dos postos pluviométricos**. Ceará, 2015. Disponível em: < <http://www.funceme.br/index.php/areas/23-monitoramento/meteorol%C3%B3gico/548-gr%C3%A1fico-de-chuvas-dos-postos-pluviom%C3%A9tricos> >. Acesso em: 5 jan. 2016.
- GOUMA, M. *et al.* Inactivation of spoilage yeasts in apple juice by UV–C light and in combination with mild heat. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 32, p. 146-155, 2015.
- GOVARDHAN SINGH, R. S.; NEGI, P. S.; RADHA, C. Phenolic composition, antioxidant and antimicrobial activities of free and bound phenolic extracts of *Moringa oleifera* seed flour. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 4, p. 1883-1891, 2013.
- GRAM, L. *et al.* Food spoilage: interactions between food spoilage bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, n. 1–2, p. 79-97, 2002.
- HAMZA, A. A. Ameliorative effects of *Moringa oleifera* Lam seed extract on liver fibrosis in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 1, p. 345-355, 2010.
- HAN, C. V.; BHAT, R. In vitro control of food-borne pathogenic bacteria by essential oils and solvent extracts of underutilized flower buds of *Paeonia suffruticosa* (Andr.). **Industrial Crops and Products**, v. 54, p. 203-208, 2014.
- HAYRAPETYAN, H.; HAZELEGER, W. C.; BEUMER, R. R. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by pomegranate (*Punica granatum*) peel extract in meat paté at different temperatures. **Food Control**, v. 23, n. 1, p. 66-72, 2012.
- HAZRA, S. *et al.* Quality of cooked ground buffalo meat treated with the crude extracts of *Moringa oleifera* (Lam.) leaves. **Journal of food science and technology**, India, v. 49, n. 2, p. 240-245, 2012.
- HENNEKINNE, J.-A.; DE BUYSER, M.-L.; DRAGACCI, S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 4, p. 815-836, 2012.

IKEDA, M. *et al.* Rapid and simple detection of food poisoning bacteria by bead assay with a microfluidic chip-based system. **Journal of Microbiological Methods**, v. 67, n. 2, p. 241-247, 2006.

IQBAL, S.; BHANGER, M. I. Effect of season and production location on antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaves grown in Pakistan. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 6-7, p. 544-551, 2006.

ITURRIAGA, L.; OLABARRIETA, I.; DE MARAÑÓN, I. M. Antimicrobial assays of natural extracts and their inhibitory effect against *Listeria innocua* and fish spoilage bacteria, after incorporation into biopolymer edible films. **International Journal of Food Microbiology**, v. 158, n. 1, p. 58-64, 2012.

JAISWAL, D. *et al.* Effect of *Moringa oleifera* Lam. leaves aqueous extract therapy on hyperglycemic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, n. 3, p. 392-396, 2009.

JAYAWARDANA, B. C. *et al.* Antioxidant and antimicrobial activity of drumstick (*Moringa oleifera*) leaves in herbal chicken sausages. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 1204-1208, 2015.

JOVETTA, M. P. *et al.* Thermal Inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in a Model Food. **International Journal of Food Engineering**, v. 7, n. 4, 2011.

KARABIYIKLI, Ş.; DEĞİRMENCI, H.; KARAPINAR, M. Inhibitory effect of sour orange (*Citrus aurantium*) juice on *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 55, n. 2, p. 421-425, 2014.

KIM, S.Y. *et al.* Antimicrobial Activity of Plant Extracts Against *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* on Fresh Lettuce. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 1, p. M41-M46, 2011.

LIU, H. *et al.* Visual and sensitive detection of viable pathogenic bacteria by sensing of RNA markers in gold nanoparticles based paper platform. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 62, p. 38-46, 2014.

LIU, X. *et al.* Biosensors based on modularly designed synthetic peptides for recognition, detection and live/dead differentiation of pathogenic bacteria. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 80, p. 9-16, 2016.

MARTÍNEZ-GONZÁLES, N. E. *et al.* Use of a novel medium, the Polymyxin Ceftazidime Oxford Medium, for isolation of *Listeria monocytogenes* from raw or non-pasteurized foods. **Food Microbiology**, v. 55, p. 105-111, 2016.

MATSUBARA, H. *et al.* *Alicyclobacillus acidiphilus* sp. nov., a Novel Thermo-acidophilic, w-allylic Fatty Acid-containing Bacterium Isolated from Acidic Beverages, **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.52, p. 1681-1685, 2002.

MCKNIGHT, I. C. *et al.* *Alicyclobacillus acidoterrestris* in pasteurized exotic Brazilian fruit juices: Isolation, genotypic characterization and heat resistance. **Food Microbiology**, v. 27, n. 8, p. 1016-1022, 2010.

- MEDINA, A. L. *et al.* Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. **Food Chemistry**, v. 128, n. 4, p. 916-922, 2011.
- MEHTA, K. *et al.* Effect of fruits of *Moringa oleifera* on the lipid profile of normal and hypercholesterolaemic rabbits. **J Ethnopharmacol**, v. 86, n. 2-3, p. 191-5, Jun. 2003.
- MIAO, J. *et al.* Inhibitory effects of a novel antimicrobial peptide from kefir against *Escherichia coli*. **Food Control**, v. 65, p. 63-72, 2016.
- MOLVA, C.; BAYSAL, A. H. Antimicrobial activity of grape seed extract on *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 3922 vegetative cells and spores in apple juice. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 1, p. 238-245, 2015.
- MOYO, B. *et al.* Polyphenolic content and antioxidant properties of *Moringa oleifera* leaf extracts and enzymatic activity of liver from goats supplemented with *Moringa oleifera* leaves/sunflower seed cake. **Meat Science**, v. 91, n. 4, p. 441-447, 2012.
- NAKAYAMA, M. *et al.* Mechanism of the combined anti-bacterial effect of green tea extract and NaCl against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7. **Food Control**, v. 25, n. 1, p. 225-232, 2012.
- NASCIMENTO, J. A. *et al.* Ethanolic extracts of *Moringa oleifera* Lam. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 114, n. 2, p. 833-838, 2013.
- NEPOLEAN, P.; ANITHA, J.; RENITTA, R. E. Isolation, analysis and identification of phytochemicals of antimicrobial activity of *Moringa oleifera* Lam. **Current Biotica**, India, v. 3, n. 1, 2009.
- NOVAIS, T. S. *et al.* Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 5-8, 2003.
- OLIVEIRA, D. A. *et al.* Antimicrobial activity and composition profile of grape (*Vitis vinifera*) pomace extracts obtained by supercritical fluids. **Journal of Biotechnology**, v. 164, n. 3, p. 423-432, 2013.
- ONSARE, J. G.; KAUR, H.; ARORA, D. S. Antimicrobial activity of *Moringa oleifera* from different locations against some human pathogens. **Academia Journal of Medicinal Plants**, v. 1, p. 80-91, May. 2013.
- PAGLIARULO, C. *et al.* Inhibitory effect of pomegranate (*Punica granatum* L.) polyphenol extracts on the bacterial growth and survival of clinical isolates of pathogenic *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Food Chemistry**, v. 190, p. 824-831, 2016.
- PALIWAL, R., SHARMA, V., PRACHETA, S. S. H. Hepatoprotective and antioxidant potential of *Moringa oleifera* pods against DMBA-induced hepatocarcinogenesis in male mice. **International Journal of Drug Development and Research**, v. 3, p. 128-138, 2011.
- PEIXOTO, J. R. *et al.* In vitro antibacterial effect of aqueous and ethanolic *Moringa* leaf extracts. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 4, n. 3, p. 201-204, 2011.

PESAVENTO, G. *et al.* Antibacterial activity of Oregano, Rosmarinus and Thymus essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in beef meatballs. **Food Control**, v. 54, p. 188-199, 2015.

PISKERNIK, S. *et al.* Control of *Alicyclobacillus* spp. vegetative cells and spores in apple juice with rosemary extracts. **Food Control**, v. 60, p. 205-214, 2016.

PORALLA, K.; KÖNIG, W. A. The occurrence of ω -cycloheptane fatty acids in a thermoacidophilic bacillus. **FEMS Microbiology Letters**, v. 16, n. 2-3, p. 303-306, 1983.

PRITCHARD, M. *et al.* A study of the parameters affecting the effectiveness of *Moringa oleifera* in drinking water purification. **Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C**, v. 35, n. 13-14, p. 791-797, 2010.

RAMACHANDRAN, C.; PETER, K. V.; GOPALAKRISHNAN, P. K. Drumstick (*Moringa oleifera*): A multipurpose Indian vegetable. **Economic Botany**, v. 34, n. 3, p. 276-283, 1980.

RATSHILIVHA, N. *et al.* The variation in antimicrobial and antioxidant activities of acetone leaf extracts of 12 *Moringa oleifera* (Moringaceae) trees enables the selection of trees with additional uses. **South African Journal of Botany**, v. 92, p. 59-64, 2014.

ROCHA, M. F. G. *et al.* *Moringa oleifera* inhibits growth of *Candida* spp. and *Hortaea werneckii* isolated from *Macrobrachium amazonicum* prawn farming with a wide margin of safety. **Ciência Rural**, v. 44, p. 2197-2203, 2014.

RODRÍGUEZ-LÁZARO, D. *et al.* Identification and molecular characterization of pathogenic bacteria in foods confiscated from non-EU flights passengers at one Spanish airport. **International Journal of Food Microbiology**, v. 209, p. 20-25, 2015.

RUSAK, G. *et al.* Phenolic content and antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used. **Food Chemistry**, v. 110, n. 4, p. 852-858, 2008.

SÁNCHEZ-MACHADO, D. I. *et al.* Nutritional quality of edible parts of *Moringa oleifera*. **Food Analytical Methods**, v. 3, n. 3, p. 175-180, 2009.

SHARMA, B. K. *et al.* Lubricant properties of Moringa oil using thermal and tribological techniques. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 96, n. 3, p. 999-1008, 2009.

SHI, H. *et al.* A universal primer multiplex PCR method for typing of toxinogenic *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 95, n. 6, p. 1579-1587, 2012.

SIDDHURAJU, P.; BECKER, K. Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 8, p. 2144-2155, 2003.

SIHTO, H.-M. *et al.* Growth behavior and temporal enterotoxin D expression of *Staphylococcus aureus* strains under glucose and lactic acid stress. **Food Control**, v. 62, p. 69-73, 2016.

SILVA, N. *et al.* **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 4. ed. São Paulo: UFSM, 2010.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Lett Appl Microbiol**, v. 26, n. 2, p. 118-22, 1998.

SOUSA, C. P. Segurança alimentar e doenças veiculadas por alimentos: utilização do grupo coliforme como um dos indicadores de qualidade de alimentos. **Revista APS**, v.9, n.1, p. 83-88, 2006.

STEFANELLO, M. E. A. *et al.* Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Eugenia chlorophylla* (Myrtaceae). **Journal of Essential Oil Research**, v. 20, p. 75-78, 2008.

STEYN, C. E.; CAMERON, M.; WITTHUHN, R. C. Occurrence of *Alicyclobacillus* in the fruit processing environment – A review. **International Journal of Food Microbiology**, South Africa, v. 147, 2011.

STOHS, S. J.; HARTMAN, M. J. Review of the safety and efficacy of *Moringa oleifera*. **Phytotherapy Research**, v. 29, n. 6, p. 796-804, 2015.

TAKAHASHI, H. *et al.* Use of ferulic acid as a novel candidate of growth inhibiting agent against *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat food. **Food Control**, v. 33, n. 1, p. 244-248, 2013.

TALREJA, T. Screening of crude extract of flavonoids of *Moringa oleifera* against bacteria and fungal pathogen. **Journal of Phytology**, v. 2, n. 11, p. 31-35, 2010.

TERAMOTO, H.; SALAHEEN, S.; BISWAS, D. Contamination of post-harvest poultry products with multidrug resistant *Staphylococcus aureus* in Maryland-Washington DC metro area. **Food Control**, v. 65, p. 132-135, 2016.

TESFAY, S. Z.; MODI, A. T.; MOHAMMED, F. The effect of temperature in moringa seed phytochemical compounds and carbohydrate mobilization. **South African Journal of Botany**, v. 102, p. 190-196, 2016.

THALLER, M. C. *et al.* **Tracking acquired antibiotic resistance in commensal bacteria of galápagos land iguanas: no man, no resistance**. Singapore: Laurent Rénia, 2010.

TSAKNIS, J. *et al.* Characterization of *Moringa oleifera* variety Mbololo seed oil of Kenya. **J Agric Food Chem**, v. 47, n. 11, p. 4495-9, 1999.

VALGAS, C. *et al.* Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Braz. J. Microbiol.**, v. 38, n. 2, p. 369-380, 2007.

VIEIRA, G. H. F. *et al.* Antibacterial effect (*in vitro*) of *Moringa oleifera* and *Annona muricata* against Gram positive and Gram negative bacteria. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 52, p. 129-132, 2010.

VIGILÂNCIA epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos: VE-DTA, São Paulo, 2014. Disponível em:
<https://disciplinas.stoa.usp.br/pluginfile.php/270383/mod_resource/content/1/Vigil%C3%A2ncia%20Epidemiol%C3%B3gica%20das%20Doen%C3%A7as%20Transmitidas%20por%20Alimentos%20E2%80%9320VE-DTA.pdf>. Acesso em: 7 jul. 2014.

VONGSAK, B.; SITHISARN, P.; GRITSANAPAN, W. Simultaneous HPLC Quantitative Analysis of Active Compounds in Leaves of *Moringa oleifera* Lam. **Journal of Chromatographic Science**, v. 52, n. 7, p. 641-645, 2014.

VOON, H. C.; BHAT, R.; RUSUL, G. Flower extracts and their essential oils as potential antimicrobial agents for food uses and pharmaceutical applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 11, n. 1, p. 34-55, 2012.

WANG, J.; HU, X.; WANG, Z. Kinetics models for the inactivation of *Alicyclobacillus acidiphilus* DSM14558T and *Alicyclobacillus acidoterrestris* DSM 3922T in apple juice by ultrasound. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, n. 3, p. 177-181, 2010.

WU, J. *et al.* Pomegranate peel (*Punica granatum* L) extract and Chinese gall (*Galla chinensis*) extract inhibit *Vibrio parahaemolyticus* and *Listeria monocytogenes* on cooked shrimp and raw tuna. **Food Control**, v. 59, p. 695-699, 2016.

WU, Q. *et al.* Prevalence and genetic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* in drinking water in Guangdong Province of China. **LWT - Food Science and Technology**, v. 69, p. 24-31, 2016.

YANG, S. *et al.* Dual-recognition detection of *Staphylococcus aureus* using vancomycin-functionalized magnetic beads as concentration carriers. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 78, p. 174-180, 2016.

ZHANG, Y. *et al.* Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **Food Control**, v. 59, p. 282-289, 2016.

ZHAO, B.; HALL III, C. A. Composition and antioxidant activity of raisin extracts obtained from various solvents. **Food Chemistry**, v. 108, n. 2, p. 511-518, 2008.

ZHAO, D.; SHAH, N. P. Tea and soybean extracts in combination with milk fermentation inhibit growth and enterocyte adherence of selected foodborne pathogens. **Food Chemistry**, v. 180, p. 306-316, 2015.

ZHU, M. J. *et al.* Antimicrobial efficacy of grape seed extract against *Escherichia coli* O157:H7 growth, motility and Shiga toxin production. **Food Control**, v. 51, p. 177-182, 2015.

ZUNABOVIC, M.; DOMIG, K. J.; KNEIFEL, W. Practical relevance of methodologies for detecting and tracing of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and manufacture environments – A review. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 2, p. 351-362, 2011.

APÊNDICE A – RESULTADO DAS AVALIAÇÕES DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS DE SEMENTES DE MORINGA PELO MÉTODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR CONTRA *A. acidoterrestris* (AA), *L. monocytogenes* (LM), *S. aureus* (SA), *E. coli* (EC), *P. aeruginosa* (PA) e *S. Enteritidis* (SE)

Agente antibacteriano	Diâmetro da zona de inibição (mm)						
	AA		LM	AS	EC	PA	SE
	BAM	MHAa	MHA+YE	MHA	MHA	MHA	MHA
EAM1 (100%)	-	-	-	-	-	-	-
EAM1 (50%)	-	-	-	-	-	-	-
EAM2 (100%)	34	32	20	25	-	-	-
EAM2 (50%)	26	27	18	22	-	-	-
EHM1 (100%)	31	44	-	-	-	-	-
EHM1 (50%)	18	21	-	-	-	-	-
EHM2 (100%)	12	12	-	-	-	-	-
EHM2 (50%)	13	17	-	-	-	-	-
EEM1 (100%)	27	25	17	20	11	9	-
EEM1 (50%) Etol	20	19	18	19	-	-	-
EEM1 (50%) DMSO	16	18	15	17	-	-	-
EEM2 (100%)	-	-	-	-	-	-	-
EEM2 (50%) Etol	-	-	-	-	-	-	-
EEM2 (50%) DMSO	-	-	-	-	-	-	-

Fonte: Elaborado pela autora.

EAM1 100% (extrato aquoso das sementes M1 puro); EAM1 50% (extrato aquoso das sementes M1 diluído com metade de água); EAM2 100% (extrato aquoso das sementes M2 puro); EAM2 50% (extrato aquoso das sementes M2 diluído com metade de água); EHM1 100% (extrato hexânico das sementes M1 puro); EHM1 50% (extrato hexânico das sementes M1 diluído com metade de tween 20 a 20%); EHM2 100% (extrato hexânico das sementes M2 puro); EHM2 50% (extrato hexânico das sementes M2 diluído com metade de tween 20 a 20%); EEM1 100% (extrato etanólico das sementes M1 puro); EEM1 50% Etol (extrato etanólico das sementes M1 diluído em metade de álcool etílico); EEM1 50% DMSO (extrato etanólico das sementes M1 diluído em metade de DMSO a 8%); EEM2 100% (extrato etanólico das sementes M2 puro); EEM2 50% Etol (extrato etanólico das sementes M2 diluído em metade de álcool etílico); EEM2 50% DMSO (extrato etanólico das sementes M2 diluído em metade de DMSO a 8%).

APÊNDICE B – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO AQUOSO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES CONTRA *A. acidoterrestris*, *L. monocytogenes* e *S. aureus*

Concentração do extrato aquoso	Zona de inibição (mm)		
	<i>A. acidoterrestris</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>
100%	29,0 ± 0	18,7 ± 0,6	24,0 ± 0
50%	24,3 ± 0,6	17,0 ± 1,4	21,3 ± 0,6
25%	18,0 ± 1,0	11,7 ± 0,6	18,7 ± 0,6
12,50%	14,3 ± 0,6	–	15 ± 0
6,25%	–	–	–
3,12%	–	–	–
1,60%	–	–	–
0,78%	–	–	–
0,39%	–	–	–

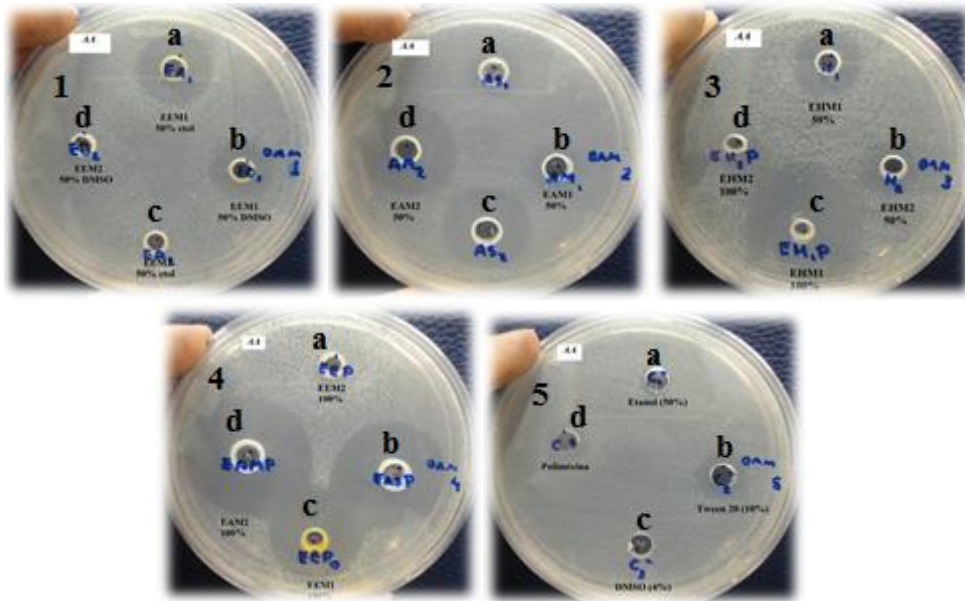
Fonte: elaborado pela autora.

APÊNDICE C – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO ETANÓLICO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES CONTRA *A. acidoterrestris*, *L. monocytogenes* e *S. aureus*

Concentração do extrato etanólico	Zona de inibição (mm)		
	<i>A. acidoterrestris</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>
100%	19,3 ± 0,6	17,0 ± 1,7	15,3 ± 0,6
50%	16,0 ± 0	14,1 ± 1,0	12,7 ± 0,6
25%	13,7 ± 0,6	13,3 ± 0,6	12 ± 1
12,5%	11,3 ± 1,1	11,7 ± 0,6	11,3 ± 0,6
6,25%	10,3 ± 0,6	–	10,7 ± 0,6
3,12%	11,5 ± 2,12	–	10,5 ± 0,7
1,6%	10,5 ± 2,12	–	–
0,78%	9 ± 0	–	–
0,39%	–	–	–

Fonte: elaborado pela autora.

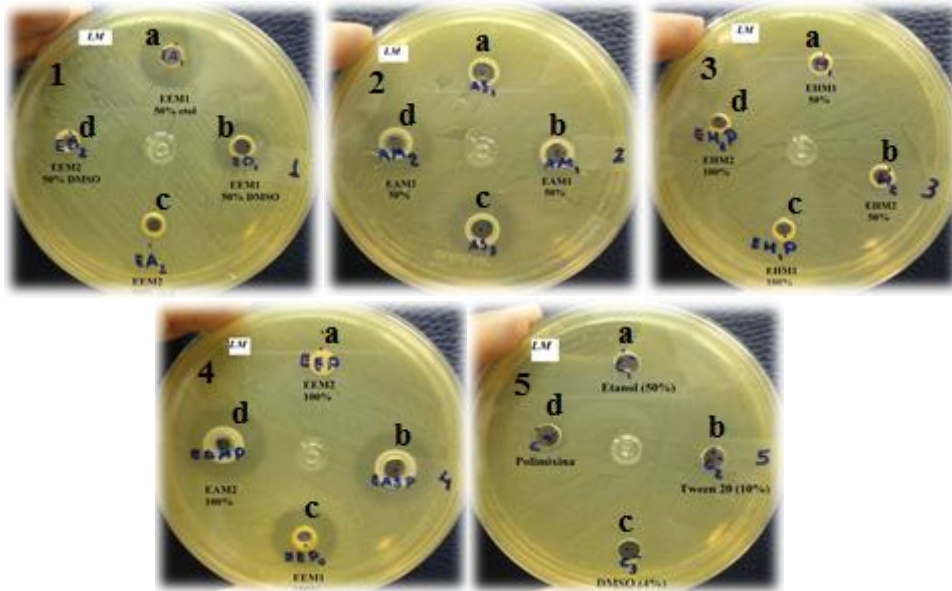
APÊNDICE D – PLACAS CONTENDO MEIO BAM (*Bacillus acidocaldarius* medium) INOCULADO COM *Alicyclobacillus acidoterrestris*



Fonte: autoria própria.

1a – extrato etanólico das sementes colhidas no primeiro semestre (M1) diluído em 50% de álcool etílico (EEM1 50% etol); 1b – extrato etanólico das sementes M1 diluído em 50% de DMSO a 8% (EEM1 50% DMSO); 1c – extrato etanólico das sementes M2 diluído em 50% de álcool etílico (EEM2 50% etol); 1d – extrato etanólico das sementes M2 diluído em 50% de DMSO a 8% (EEM2 50% DMSO); 2b – extrato aquoso das sementes M1 diluído com 50% de água (EAM1 50%); 2d – extrato aquoso das sementes M2 diluído com 50% de água (EAM2 50%); 3a – extrato hexânico das sementes M1 diluído com 50% de tween 20 a 20% (EHM1 50%); 3b – extrato hexânico das sementes M2 diluído com 50% de tween 20 a 20% (EHM2 50%); 3c – extrato hexânico das sementes M1 puro (EHM1 100%); 3d – extrato hexânico das sementes M2 puro (EHM2 100%); 4a – extrato etanólico das sementes M2 puro (EEM2 100%); 4c – extrato etanólico das sementes M1 puro (EEM1 100%); 4d – extrato aquoso das sementes M2 puro (EAM2 100%); 5a – controle negativo: etanol (50%); 5b – controle negativo: tween 20 (10%); 5c – controle negativo: DMSO (4%); 5d – controle positivo: polimixina.

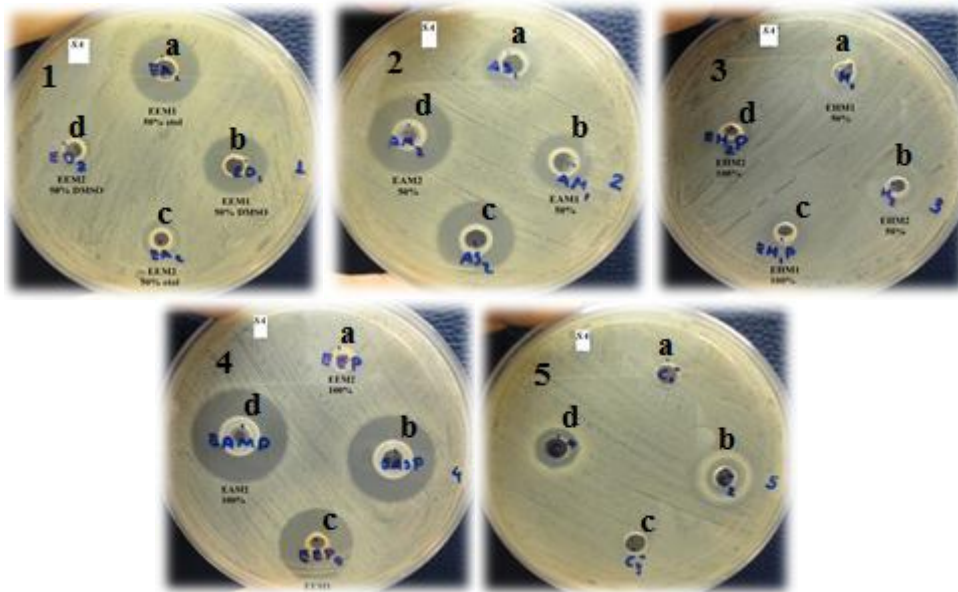
APÊNDICE E – PLACAS CONTENDO ÁGAR MUELLER-HINTON ADICIONADO DE EXTRATO DE LEVEDURA (MHA-YE) INOCULADO COM *Listeria monocytogenes*



Fonte: autoria própria.

1a – extrato etanólico das sementes M1 diluído em 50% de álcool etílico (EEM1 50% etol); 1b – extrato etanólico das sementes M1 diluído em 50% de DMSO a 8% (EEM1 50% DMSO); 1c – extrato etanólico das sementes M2 diluído em 50% de álcool etílico (EEM2 50% etol); 1d – extrato etanólico das sementes M2 diluído em 50% de DMSO a 8% (EEM2 50% DMSO); 2b – extrato aquoso das sementes M1 diluído com 50% de água (EAM1 50%); 2d – extrato aquoso das sementes M2 diluído com 50% de água (EAM2 50%); 3a – extrato hexânico das sementes M1 diluído com 50% de tween 20 a 20% (EHM1 50%); 3b – extrato hexânico das sementes M2 diluído com 50% de tween 20 a 20% (EHM2 50%); 3c – extrato hexânico das sementes M1 puro (EHM1 100%); 3d – extrato hexânico das sementes M2 puro (EHM2 100%); 4a – extrato etanólico das sementes M2 puro (EEM2 100%); 4c – extrato etanólico das sementes M1 puro (EEM1 100%); 4d – extrato aquoso das sementes M2 puro (EAM2 100%); 5a – controle negativo: etanol (50%); 5b – controle negativo: tween 20 (10%); 5c – controle negativo: DMSO (4%); 5d – controle positivo: polimixina.

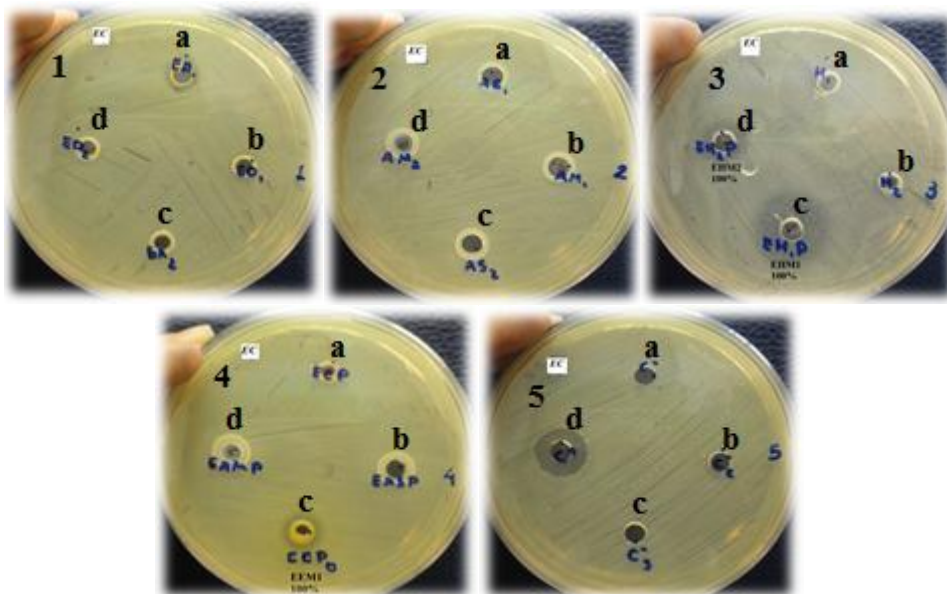
**APÊNDICE F – PLACAS CONTENDO ÁGAR MUELLER-HINTON (MHA)
INOCULADO COM *Staphylococcus aureus***



Fonte: autoria própria.

1a – extrato etanólico das sementes M1 diluído em 50% de álcool etílico (EEM1 50% etol); 1b – extrato etanólico das sementes M1 diluído em 50% de DMSO a 8% (EEM1 50% DMSO); 1c – extrato etanólico das sementes M2 diluído em 50% de álcool etílico (EEM2 50% etol); 1d – extrato etanólico das sementes M2 diluído em 50% de DMSO a 8% (EEM2 50% DMSO); 2b – extrato aquoso das sementes M1 diluído com 50% de água (EAM1 50%); 2d – extrato aquoso das sementes M2 diluído com 50% de água (EAM2 50%); 3a – extrato hexânico das sementes M1 diluído com 50% de tween 20 a 20% (EHM1 50%); 3b – extrato hexânico das sementes M2 diluído com 50% de tween 20 a 20% (EHM2 50%); 3c – extrato hexânico das sementes M1 puro (EHM1 100%); 3d – extrato hexânico das sementes M2 puro (EHM2 100%); 4a – extrato etanólico das sementes M2 puro (EEM2 100%); 4c – extrato etanólico das sementes M1 puro (EEM1 100%); 4d – extrato aquoso das sementes M2 puro (EAM2 100%); 5a – controle negativo: etanol (50%); 5b – controle negativo: tween 20 (10%); 5c – controle negativo: DMSO (4%); 5d – controle positivo: polimixina.

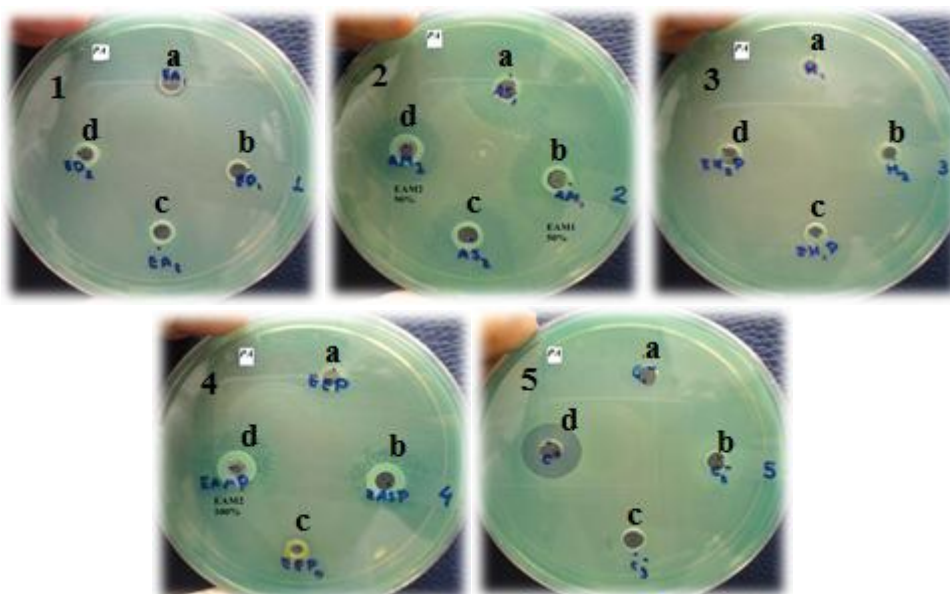
**APÊNDICE G – PLACAS CONTENDO ÁGAR MUELLER-HINTON (MHA)
INOCULADO COM *Escherichia coli***



Fonte: autoria própria.

1a – extrato etanólico das sementes M1 diluído em 50% de álcool etílico (EEM1 50% etol); 1b – extrato etanólico das sementes M1 diluído em 50% de DMSO a 8% (EEM1 50% DMSO); 1c – extrato etanólico das sementes M2 diluído em 50% de álcool etílico (EEM2 50% etol); 1d – extrato etanólico das sementes M2 diluído em 50% de DMSO a 8% (EEM2 50% DMSO); 2b – extrato aquoso das sementes M1 diluído com 50% de água (EAM1 50%); 2d – extrato aquoso das sementes M2 diluído com 50% de água (EAM2 50%); 3a – extrato hexânico das sementes M1 diluído com 50% de tween 20 a 20% (EHM1 50%); 3b – extrato hexânico das sementes M2 diluído com 50% de tween 20 a 20% (EHM2 50%); 3c – extrato hexânico das sementes M1 puro (EHM1 100%); 3d – extrato hexânico das sementes M2 puro (EHM2 100%); 4a – extrato etanólico das sementes M2 puro (EEM2 100%); 4c – extrato etanólico das sementes M1 puro (EEM1 100%); 4d – extrato aquoso das sementes M2 puro (EAM2 100%); 5a – controle negativo: etanol (50%); 5b – controle negativo: tween 20 (10%); 5c – controle negativo: DMSO (4%); 5d – controle positivo: polimixina.

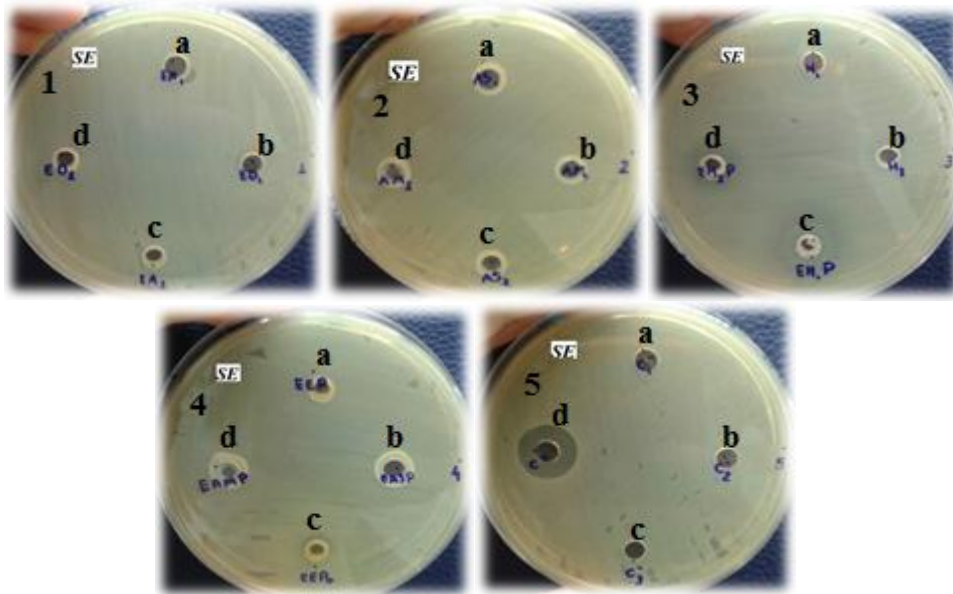
**APÊNDICE H – PLACAS CONTENDO ÁGAR MUELLER-HINTON (MHA)
INOCULADO COM *Pseudomonas aeruginosa***



Fonte: autoria própria.

1a – extrato etanólico das sementes M1 diluído em 50% de álcool etílico (EEM1 50% etol); 1b – extrato etanólico das sementes M1 diluído em 50% de DMSO a 8% (EEM1 50% DMSO); 1c – extrato etanólico das sementes M2 diluído em 50% de álcool etílico (EEM2 50% etol); 1d – extrato etanólico das sementes M2 diluído em 50% de DMSO a 8% (EEM2 50% DMSO); 2b – extrato aquoso das sementes M1 diluído com 50% de água (EAM1 50%); 2d – extrato aquoso das sementes M2 diluído com 50% de água (EAM2 50%); 3a – extrato hexânico das sementes M1 diluído com 50% de tween 20 a 20% (EHM1 50%); 3b – extrato hexânico das sementes M2 diluído com 50% de tween 20 a 20% (EHM2 50%); 3c – extrato hexânico das sementes M1 puro (EHM1 100%); 3d – extrato hexânico das sementes M2 puro (EHM2 100%); 4a – extrato etanólico das sementes M2 puro (EEM2 100%); 4c – extrato etanólico das sementes M1 puro (EEM1 100%); 4d – extrato aquoso das sementes M2 puro (EAM2 100%); 5a – controle negativo: etanol (50%); 5b – controle negativo: tween 20 (10%); 5c – controle negativo: DMSO (4%); 5d – controle positivo: polimixina.

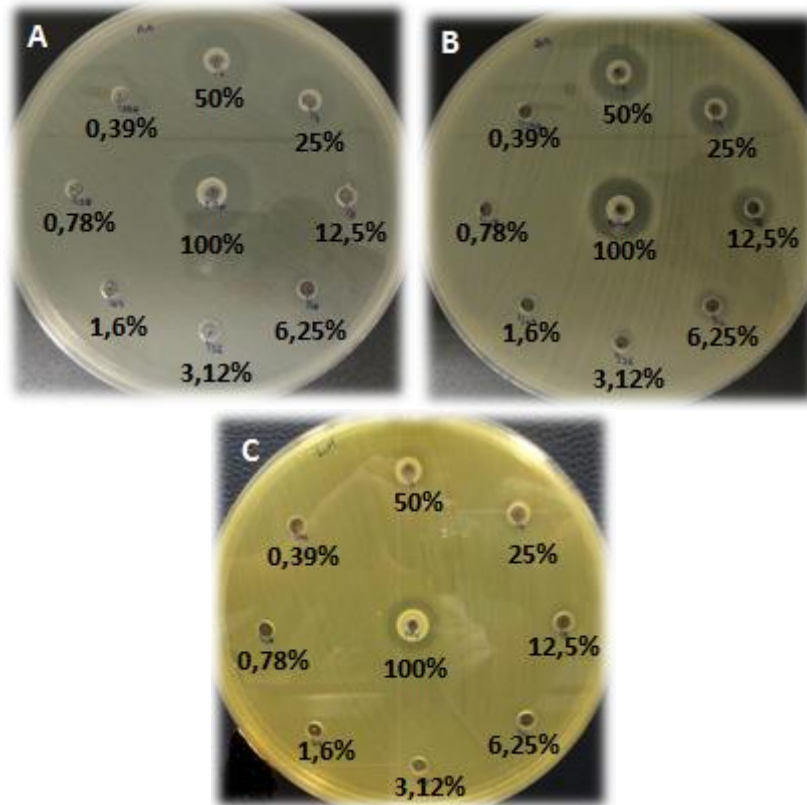
**APÊNDICE I – PLACAS CONTENDO ÁGAR MUELLER-HINTON (MHA)
INOCULADO COM *Salmonella* Enteritidis**



Fonte: autoria própria.

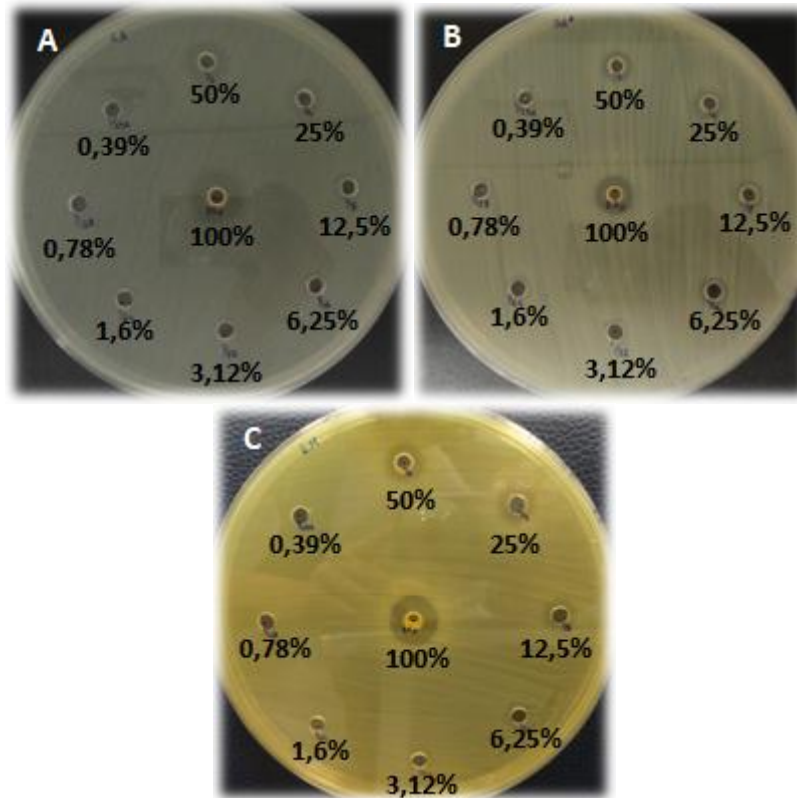
1a – extrato etanólico das sementes M1 diluído em 50% de álcool etílico (EEM1 50% etol); 1b – extrato etanólico das sementes M1 diluído em 50% de DMSO a 8% (EEM1 50% DMSO); 1c – extrato etanólico das sementes M2 diluído em 50% de álcool etílico (EEM2 50% etol); 1d – extrato etanólico das sementes M2 diluído em 50% de DMSO a 8% (EEM2 50% DMSO); 2b – extrato aquoso das sementes M1 diluído com 50% de água (EAM1 50%); 2d – extrato aquoso das sementes M2 diluído com 50% de água (EAM2 50%); 3a – extrato hexânico das sementes M1 diluído com 50% de tween 20 a 20% (EHM1 50%); 3b – extrato hexânico das sementes M2 diluído com 50% de tween 20 a 20% (EHM2 50%); 3c – extrato hexânico das sementes M1 puro (EHM1 100%); 3d – extrato hexânico das sementes M2 puro (EHM2 100%); 4a – extrato etanólico das sementes M2 puro (EEM2 100%); 4c – extrato etanólico das sementes M1 puro (EEM1 100%); 4d – extrato aquoso das sementes M2 puro (EAM2 100%); 5a – controle negativo: etanol (50%); 5b – controle negativo: tween 20 (10%); 5c – controle negativo: DMSO (4%); 5d – controle positivo: polimixina.

APÊNDICE J – PLACAS DO ENSAIO DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DO EXTRATO AQUOSO SOBRE AS BACTÉRIAS *Alicyclobacillus acidoterrestris* (A); *Staphylococcus aureus* (B) e *Listeria monocytogenes* (C)



Fonte: autoria própria.

APÊNDICE K – PLACAS DO ENSAIO DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DO EXTRATO ETANÓLICO SOBRE AS BACTÉRIAS *Alicyclobacillus acidoterrestris* (A); *Staphylococcus aureus* (B) e *Listeria monocytogenes* (C)



Fonte: autoria própria.