

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos



Dissertação

**Atividade antibacteriana de extrato de butiá (*Butia odorata*) contra
bactérias patogênicas**

Darla Silveira Volcan Maia

Pelotas, 2017

Darla Silveira Volcan Maia

**Atividade antibacteriana de extrato de butiá (*Butia odorata*) contra
bactérias patogênicas**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia
de Alimentos da Faculdade de Agronomia
Eliseu Maciel da Universidade Federal de
Pelotas como requisito parcial à obtenção
do título de Mestre em Ciência e Tecnolo-
gia de Alimentos (área do conhecimento:
Microbiologia de Alimentos)

Comitê de orientação: Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva

Prof. Dr. Fabio Clasen Chaves

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

M217a Maia, Darla Silveira Volcan

Atividade antibacteriana de extrato de butiá (*Butia odorata*) contra bactérias patogênicas / Darla Silveira Volcan Maia ; Wladimir Padilha da Silva, orientador ; Fabio Clasen Chaves, coorientador. — Pelotas, 2017.

51 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Antibacterianos naturais. 2. Patógenos transmitidos por alimentos. 3. Butiá. 4. Fitoesteróis. I. Silva, Wladimir Padilha da, orient. II. Chaves, Fabio Clasen, coorient. III. Título.

CDD : 634.4

Darla Silveira Volcan Maia

Atividade antibacteriana de extrato de butiá (*Butia odorata*) contra bactérias patogênicas

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 01/02/2017

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva (Orientador)

Doutor em Ciência dos Alimentos pela Universidade de São Paulo

Prof.^a Dr.^a Caroline Bastos

Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas

Dr.^a Julia Goldbeck

Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas

Dr.^a Graciela Völz Lopes

Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Agradecimentos

Agradeço a Deus Pai por sua graça e seu amor infinito. Aos meus pais, Daniel e Claudete, por todos os ensinamentos e exemplo de vida. Agradeço ao meu amado irmão Arão que com seu sorriso puro ensinou-me o que é felicidade, e a minha irmã Sara pelo apoio, companheirismo e amizade.

Um agradecimento especial ao meu esposo Alex por estar ao meu lado durante essa jornada e pela compreensão e carinho. Agradeço as minhas avós Sueni e Cleusa pelo amor e *mimos*.

Agradeço ao meu orientador professor Wladimir pela oportunidade e ensinamentos. Aos professores Celso e Angela pela amizade. Aos colegas e amigos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos: Andreia, Louise, Greice, Marcia, Mariana, Isabela, Tassiana, Leticia, Helena, Guilherme, Claudio, Juliana, Maiara, Ytacyana e Adriana.

Resumo

Maia, Darla Silveira Volcan. **Atividade antibacteriana de extrato de butiá (*Butia odorata*) contra bactérias patogênicas**. 2017. 51f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

A demanda por alimentos livres de conservantes químicos sintéticos tem aumentado. Nos últimos anos, vários estudos foram realizados a fim de se obter compostos antimicrobianos naturais. Alguns estudos foram realizados com frutas nativas do Brasil, no entanto, não existem estudos avaliando o potencial antibacteriano do butiá. O objetivo deste estudo foi prospectar a atividade antibacteriana de extratos de butiá (*Butia odorata*) com diferentes polaridades e caracterizar quimicamente o extrato com a melhor atividade. Um extrato hexânico e um metanólico de butiá foram avaliados quanto à sua atividade antibacteriana contra três bactérias Gram-positivas (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*) e três bactérias Gram-negativas (*Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7 e *Pseudomonas aeruginosa*), pelo método de difusão em ágar, Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM). Ambos extratos apresentaram atividade antibacteriana, entretanto, o extrato hexânico (EHB) apresentou desempenho superior, portanto realizou-se a caracterização química por CG-MS deste extrato. Interessantemente, o EHB apresentou maior atividade contra bactérias Gram-negativas, sendo *E. coli* O157:H7, a mais sensível (CBM 5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$). Entre as bactérias Gram-positivas, *S. aureus* (CBM 20 $\mu\text{L.mL}^{-1}$) foi a mais sensível. Os fitoesteróis representaram 51% do EHB, sendo gama-sitosterol o composto predominante, constituindo 22% do extrato.

Palavras-chave: antibacterianos naturais; patógenos transmitidos por alimentos; butiá; fitoesteróis

Abstract

Maia, Darla Silveira Volcan. **Antibacterial activity of butiá (*Butia odorata*) extracts against pathogenic bacteria**. 2017. 51f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

Demand for synthetic chemical preservative free foods has increased. In recent years several studies have been conducted in order to obtain natural antimicrobial compounds. Some studies were performed with native fruit from Brazil, however there are no studies evaluating the potential antibacterial of jelly palm fruits (butiá). The objective of the study was exploring the antibacterial activity of butiá (*Butia odorata*) extracts with different polarities and chemically characterize the extract with the best activity. A hexane and a methanol extract of butiá were evaluated for their antibacterial activity against three Gram-positive (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, and *Bacillus cereus*) and three Gram-negative bacteria (*Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* O157:H7, and *Pseudomonas aeruginosa*) by the agar diffusion method, Minimal Inhibitory Concentration (MIC), Minimal Bactericidal Concentration (MBC). Both extracts showed antibacterial activity, however of hexane extract (BHE) showed superior performance, therefore the chemical characterization by CG-MS for this extract. Interestingly, the BHE higher activity against Gram-negative bacteria, and *E. coli* O157:H7 was the most sensitive (MBC 5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$). Of the Gram-positive bacteria, *S. aureus* (MBC 20 $\mu\text{L.mL}^{-1}$) was the most sensitive. Phytosterols represented 51% of the BHE and gamma-sitosterol was the predominant compound constituting 22% of the extract.

Key-words: Natural antibacterials; foodborne pathogens; butiá; phytosterols

Lista de Figuras

Figura 1	(a) <i>Butia odorata</i> (b) Distribuição do gênero <i>Butia</i>	17
Figura 1	Cromatograma do extrato hexânico butiá (EHB) e perfil de fragmentação do gama-sitosterol.....	36

Lista de Tabelas

Tabela 1	Parâmetros médios de qualidade do <i>B. odorata</i> de diferentes regiões do sul do Brasil.....	17
Tabela 2	Composição química média do <i>B. odorata</i> de diferentes regiões do sul do Brasil.....	17
Tabela 1	Zonas de inibição dos extratos hexânico (EHB) e metanólico de butiá (EMB)	35
Tabela 2	Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM) dos extratos hexânico (EHB) e metanólico de butiá (EMB).....	36

Sumário

1 Introdução.....	10
2 Revisão da literatura.....	11
2.1 Doenças transmitidas por alimentos.....	11
2.2 Bactérias patogênicas.....	11
2.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	11
2.2.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	12
2.2.3 <i>Bacillus cereus</i>	12
2.2.4 <i>Salmonella</i> spp.....	13
2.2.5 <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	13
2.2.6 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
2.3 Atividade antimicrobiana de plantas.....	14
2.3.1 Frutas.....	15
2.4 Gênero <i>Butia</i>.....	16
3 Manuscrito 1 - Atividade antibacteriana de extrato de <i>Butia odorata</i> contra bactérias patogênicas	18
4 Considerações finais.....	37
Referências.....	38
Apêndices.....	48

1 Introdução

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) são uma importante causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo, constituindo um problema de saúde pública e afetando o desenvolvimento econômico dos países (WHO, 2015). Em países industrializados em torno de 30% das pessoas são afetadas por alguma DTA a cada ano (LOIZZO et al., 2010). No Brasil, foram registrados 673 surtos de DTA em 2015, sendo os principais agentes etiológicos envolvidos *Salmonella* spp., *E. coli* e *S. aureus* (BRASIL, 2016).

Para inibir o desenvolvimento de micro-organismos patogênicos, a indústria de alimentos tem usado continuamente uma ampla variedade de agentes antimicrobianos sintéticos (BAJPAI; BAEK; KANG, 2012). Contudo, seu uso tem sido reconhecido por causar alguns perigos à saúde humana, incluindo alergias respiratórias (GUTIERREZ; BARRY-RYAN; BOURKE, 2009), carcinogenicidade, teratogenicidade e toxicidade. Como consequência, os consumidores buscam alimentos livres desses agentes (FALEIRO, 2011).

Deste modo, nos últimos anos diversas pesquisas vêm sendo realizadas com o intuito de obter compostos antimicrobianos naturais. Entre os antimicrobianos mais estudados destacam-se compostos presentes em plantas, os quais têm apresentado atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas (SHEN et al., 2014; MARQUES et al., 2015; DANNENBERG et al., 2016). Alguns desses estudos foram realizados com frutas nativas do Brasil (MEDINA et al., 2011; BELDA-GALBIS et al., 2015).

Nesse contexto, espécies da família Arecaceae são atrativas do ponto de vista químico (SILVEIRA et al., 2005), sendo que o butiazeiro, pertencente a esta família, é nativo do sul da América do Sul (LORENZI et al., 2010). No sul do Brasil existem 6 espécies de *Butia*. A Universidade Federal de Pelotas vem estudando o potencial bioativo do *B. odorata* (BESKOW et al., 2015). Contudo, não existem pesquisas avaliando seu potencial antibacteriano. Desta forma o objetivo deste estudo foi prospectar a atividade antibacteriana de extratos de *B. odorata* com diferentes polaridades e caracterizar quimicamente o extrato com a melhor atividade.

2 Revisão da literatura

2.1 Doenças transmitidas por alimentos

Doença transmitida por alimento é um termo genérico, aplicado a uma síndrome geralmente constituída de anorexia, náuseas, vômitos e/ou diarreia, acompanhada ou não de febre, atribuída à ingestão de alimentos ou água contaminados. Vários fatores contribuem para a emergência dessas doenças, incluindo o aumento populacional, existência de grupos populacionais vulneráveis, o processo de urbanização desordenado e a necessidade de produção de alimentos em grande escala. Acrescenta-se, ainda, a maior exposição a alimentos destinados ao pronto consumo coletivo. As DTA podem ser causadas por bactérias, vírus, parasitas, toxinas, príons, agrotóxicos, produtos químicos e metais pesados (BRASIL, 2010).

Quando duas ou mais pessoas apresentam os mesmos sinais/sintomas após ingerir alimentos e/ou água da mesma origem, constitui-se um surto de DTA. Em 2015 foram registrados 673 surtos de DTA no Brasil. Entre 2007 e 2016, 90,5% dos surtos foram ocasionados por bactérias, sendo os principais agentes etiológicos envolvidos *Salmonella* spp., *E. coli* e *S. aureus*, seguido de *Bacillus cereus* (BRASIL, 2016).

Na União Europeia, em 2014, foram registrados 5.251 surtos de DTA, resultando em 45.665 casos humanos, 6.438 hospitalizações e 27 mortes, sendo *Salmonella* spp. responsável por 20% dos surtos (EFSA; ECDC, 2015). Nos Estados Unidos da América estima-se que, a cada ano, 31 patógenos causem 9,4 milhões de episódios de DTA, 55.961 hospitalizações e 1.351 mortes. Entre os principais agentes causadores de mortes tem-se *Salmonella* spp. não tifoide (28%) e *L. monocytogenes* (19%) (SCALLAN et al., 2011).

2.2 Bactérias patogênicas

2.2.1 *Staphylococcus aureus*

É uma bactéria gram-positiva, anaeróbia facultativa, mesófila, que está presente nas fossas nasais, cabelo e pele de humanos, tornando os manipuladores de alimentos as principais fontes de contaminação dos produtos alimentícios (FORSYTHE, 2013). Devido à capacidade de algumas cepas produzirem enterotoxinas, *S. aureus* é um importante patógeno transmitido por

alimentos (HENNEKINNE et al., 2010). Além disso, a habilidade de formar biofilme pode fazer com que este micro-organismo se torne uma contaminação persistente no ambiente de processamento de alimentos (GUTIÉRREZ et al., 2012).

A intoxicação alimentar escafilocócica ocorre após a ingestão de alimentos contendo enterotoxinas estafilocócicas em virtude da manipulação inadequada ou da contaminação da matéria-prima, e posterior estocagem a temperaturas inadequadas (ARGUDIN; MENDOZA; RODICIO, 2010).

2.2.2 *Listeria monocytogenes*

Essa bactéria foi reconhecida como um patógeno transmitido por alimentos a partir de surtos de listeriose ocorridos na década de 1980 (FARBER; PETERKIN, 1991). A principal via de transmissão desse patógeno para humanos é através do consumo de alimentos contaminados (ALLERBERGER; WAGNER, 2010).

Listeria monocytogenes pode se multiplicar em uma ampla faixa de pH (4,1 – 9,6), baixa atividade de água, alta concentração salina (10%) (PAUL et al., 2014) e sob temperaturas de refrigeração (WALKER; ARCHER; BANKS, 1990). Embora a listeriose tenha uma baixa incidência (PAINTER et al., 2013), a taxa de letalidade em surtos é de 25% (NOORDHOUT et al., 2014) e a taxa de hospitalização fica acima de 95% (SCALLAN et al., 2011).

2.2.3 *Bacillus cereus*

É uma bactéria gram-positiva, formadora de esporos, que pode causar duas formas clínicas distintas de DTA: a síndrome emética e a síndrome diarreica (GRANUM; LUND, 1997). A síndrome emética ocorre pela ingestão de toxinas pré-formadas no alimento e os sintomas aparecem em torno de 5 h após a ingestão da toxina. Essa toxina é altamente resistente ao aquecimento e pH extremos, não sendo degradada durante o tratamento térmico ou passagem pelo trato gastrointestinal (RAJKOVIC et al., 2008). Já na síndrome diarreica a toxina é formada no intestino do hospedeiro, caracterizando uma infecção alimentar. Os sintomas ocorrem 8 – 16 h após o consumo do alimento contaminado (BEECHER; SCHOENI; WONG, 1995).

Produtos processados a altas temperaturas e, após, estocados sob refrigeração, têm maior risco de causarem DTA associada a *B. cereus* (HEYNDRICKX; SCHELDEMAN, 2002). Isto porque o aquecimento (> 80 °C) ativa o endosporo, e a multiplicação das células vegetativas é facilitada pela diminuição da microbiota competidora, inativada pelo aquecimento (SCHELDEMAN et al., 2006).

2.2.4 *Salmonella* spp.

O gênero *Salmonella* compreende duas espécies, *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica*, com mais de 2.500 sorovares (GRIMONT; WEILL, 2007), sendo que *Salmonella enterica* possui 6 subespécies (ISSENHUTH-JEANJEAN et al., 2014). Embora todos os sorovares sejam potencialmente patogênicos, apenas alguns sorovares de *S. enterica* subsp. *enterica* são de importância em saúde pública (KTSOYAN et al., 2013).

Salmonella spp. é o principal agente etiológico de DTA em todo o mundo. As infecções causadas por *Salmonella* spp. são associadas, predominantemente, com alimentos de origem animal com destaque para frangos e produtos derivados de frangos (MEAD et al., 2010). Mundialmente, estima-se que ocorram 80,3 milhões de casos de salmonelose transmitida por alimentos a cada ano, com 155.000 mortes (MAJOWICZ et al., 2010).

2.2.5 *Escherichia coli* O157:H7

Escherichia coli é um micro-organismo gram-negativo, comensal do trato gastrointestinal do homem e animais. Contudo, alguns grupos de cepas de *E. coli* são patogênicas. *Escherichia coli* patogênicas são comumente classificadas em 6 patotipos: *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* de aderência difusa (DAEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) (FORSYTHE, 2013).

Escherichia coli O157:H7 é uma EHEC e um dos mais importantes patógenos transmitidos por alimentos, devido a produção da toxina de Shiga (STEC) que pode causar doenças severas, como a colite hemorrágica, que pode evoluir para síndrome hemolítica urêmica (BUCHANAN, 1997; AMANI et al., 2015). Anualmente, *E. coli* O157:H7 é responsável por mais de 3.000

hospitalizações nos EUA, sendo que 0,5% dos casos resultam em mortes (FOULADKHAH; GEORNARAS; SOFOS, 2013).

2.2.6 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas spp. é um dos principais gêneros bacterianos formadores de biofilme (RAJKOWSKI, 2009). *Pseudomonas aeruginosa*, por exemplo, produz exopolissacarídeos que são importantes constituintes do biofilme (REHM, 2009). É uma bactéria gram-negativa, que pode ser isolada de solo inabitado, água, vegetação, animais, pele e garganta de pessoas saudáveis (MORRISON; WENZEL, 1984).

Pseudomonas aeruginosa é um micro-organismo patogênico produtor de um importante fator de virulência, a enzima elastase B (STEWART; COSTERTON, 2001). Essa protease secretada por *P. aeruginosa* degrada proteínas do tecido do hospedeiro e biomoléculas envolvidas na imunidade inata (CATHCART et al., 2009).

2.3 Atividade antimicrobiana de plantas

A consciência dos consumidores sobre os problemas associados aos aditivos sintéticos tem gerado um perfil de consumidores denominados “verdes”, que exigem a ausência de aditivos na conservação dos alimentos (FALEIRO, 2011). Como resultado, a indústria alimentícia enfrenta desafios para produzir antimicrobianos naturais, para assim, reduzir o uso de conservantes químicos sintéticos (WEERAKKODY et al., 2010). Substâncias que ocorrem naturalmente e são derivadas diretamente de sistemas biológicos, sem alteração ou modificação em laboratório são reconhecidas como antimicrobianos naturais (LI et al., 2011). Diversas moléculas naturais podem inibir o desenvolvimento de micro-organismos, bem como induzir a sua morte (BOULEKBACHE-MAKHLOUF; SLIMANI; MADANI, 2013).

Embora os antimicrobianos sintéticos sejam aprovados em muitos países, a tendência recente tem sido o uso de conservantes naturais, devido aos efeitos adversos daqueles aditivos para a saúde. Portanto, fontes alternativas de conservantes naturais precisam ser exploradas (NEGI, 2012). Estima-se que existam 250.000 a 500.000 espécies de plantas na Terra

(BORRIS, 1996), entretanto, apenas um décimo destas tem sido exploradas (NEGI, 2012).

Agentes antimicrobianos estão presentes naturalmente nos tecidos das plantas, como um mecanismo de defesa contra invasão microbiana (SOFOS et al., 1998). Os principais grupos de compostos responsáveis pela atividade antimicrobiana das plantas incluem fenólicos, ácidos fenólicos, quinonas, saponinas, flavonoides, taninos, cumarinas, terpenos e alcaloides (LAI; ROY, 2004). Variações na estrutura e composição química desses compostos resultam em diferenças na sua ação antimicrobiana (SAVOIA, 2012).

O mecanismo de ação dos antimicrobianos naturais não é totalmente compreendido, contudo, o rompimento da membrana por terpenos e fenólicos, quelação de metais por fenóis e flavonoides e efeito no material genético por cumarinas e alcaloides, são alguns dos mecanismos sugeridos para a inibição da multiplicação de micro-organismos (COWAN, 1999).

A eficácia de um composto antimicrobiano depende do tipo, gênero, espécie e do micro-organismo alvo (GOULD, 1989). Em geral, bactérias gram-positivas são mais sensíveis a compostos oriundos de plantas do que bactérias gram-negativas (SHAN et al., 2007). Acredita-se que isso ocorre devido a diferenças na estrutura celular dessas bactérias. Em bactérias gram-positivas as substâncias antibacterianas podem penetrar através da parede celular e atacar a membrana citoplasmática, resultando no extravasamento do citoplasma (KALEMBA; KUNICKA, 2003). Já as bactérias gram-negativas possuem uma membrana externa que lhes confere proteção a vários agentes (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

2.3.1 Frutas

Com o crescente interesse pelos chamados “aditivos verdes”, diversas pesquisas têm avaliado antimicrobianos de ocorrência natural que possam estender a vida útil de alimentos perecíveis (BURT, 2004). Entre estas, tem-se estudos relatando o potencial antimicrobiano de frutas. Shen et al. (2014), por exemplo, pesquisaram a atividade antimicrobiana de extratos de mirtilo (*Vaccinium corymbosum* L.) frente a *L. monocytogenes* e *Salmonella*

Enteritidis, obtendo uma Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 300 e 450 mg. mL⁻¹, respectivamente.

Côté et al. (2011) avaliaram o efeito antimicrobiano de extratos fenólicos de oxicoco (*Vaccinium macrocarpon*) contra sete bactérias patogênicas de importância em alimentos, encontrando uma CIM de 12,6 a 50,4 µg de fenol/poço (poço da placa de microdiluição) para as diferentes bactérias testadas na extração água/metanol (85/15, v/v). Já Fernandes et al. (2014), testaram o potencial antimicrobiano da goiaba (*Psidium guajava* L.) frente a *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, encontrando uma CIM de 100, 250 e 500 µg.mL⁻¹, respectivamente.

Algumas pesquisas também foram realizadas com frutas nativas do Brasil, como araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) e guaraná (*Paullinia cupana* Mart.). O extrato de araçá, tanto o amarelo como o vermelho, inibiu *S. Enteritidis* (CIM= 5%) (MEDINA et al., 2011). Já o extrato de guaraná em concentrações entre 16 e 128 µg.mL⁻¹, inibiu tanto bactérias gram-positivas como gram-negativas (BASILE et al., 2005).

2.4 Gênero *Butia*

O gênero *Butia*, pertence à família botânica Arecaceae (SCHWARTZ et al., 2010). São palmas subtropicais que ocorrem em áreas abertas e em florestas de Araucária, com distribuição em alguns países da América do Sul (ENDERSON; GALEANO; BERNAL, 1995). As plantas ocorrem em populações agregadas e em grande número, chamado *butiazais*, podendo ter até 12 m de altura (LORENZI et al., 2004). As frutas são ovóides, cuja cor varia do amarelo ao laranja até o vermelho, com um mesocarpo carnudo, doce e ácido (SCHWARTZ et al., 2010). A maturação ocorre no verão, com a máxima produção em fevereiro (ROSA; CASTELLANI; REIS, 1998) (Figura 1).



Figura 1 – (a) *Butia odorata* (b) Distribuição do gênero *Butia*.

Fonte: HOFFMANN et al., 2014

Ferrão et al. (2013) avaliaram a composição química e os parâmetros de qualidade do *B. odorata* de diferentes regiões do sul do Brasil (Tabelas 1 e 2). A Universidade Federal de Pelotas também vem realizando pesquisas buscando caracterizar e avaliar o potencial bioativo do *B. odorata* (BESKOW et al., 2015).

Tabela 1 – Parâmetros médios de qualidade do *B. odorata* de diferentes regiões do sul do Brasil

SST (°Brix)	pH	ATT (% ácido cítrico)
12,39	3,5	1,6

SST = sólidos solúveis totais; ATT: acidez total titulável

Fonte: FERRÃO et al., 2013

Tabela 2 – Composição química média do *B. odorata* de diferentes regiões do sul do Brasil

Umidade (%)	Cinzas (%)	Proteína bruta (%)	Fibra bruta (%)	Lipídios totais (%)	Carboidratos (%)
81,22	0,62	0,69	1,67	1,25	14,54

Fonte: FERRÃO et al., 2013

3 Manuscrito 1 – Atividade antibacteriana de extrato de *Butia odorata* contra bactérias patogênicas

Darla Silveira Volcan Maia¹, Bianca Camargo Aranha¹, Fabio Clasen Chaves¹,
Wladimir Padilha da Silva^{1,2}

¹Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Brasil;

²Núcleo de Biotecnologia.

Autor correspondente

Wladimir Padilha da Silva, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial; Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, Brasil.

E- mail: wladimir@pq.cnpq.br

(Manuscrito escrito de acordo com as normas do periódico *Food Control*).

Resumo

A demanda por alimentos livres de conservantes químicos sintéticos tem aumentado. Nos últimos anos, vários estudos foram realizados a fim de se obter compostos antimicrobianos naturais. Alguns estudos foram realizados com frutas nativas do Brasil, no entanto, não existem estudos avaliando o potencial antibacteriano do butiá. O objetivo do estudo foi produzir extratos de butiá com polaridades distintas, testar sua atividade antibacteriana contra bactérias patogênicas e caracterizar quimicamente o extrato com melhor desempenho. Um extrato hexânico e um metanólico de butiá foram avaliados quanto à sua atividade antibacteriana contra três bactérias Gram-positivas

(*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*) e três bactérias Gram-negativas (*Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* O157:H7 e *Pseudomonas aeruginosa*), pelo método de difusão em ágar, Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM). Ambos extratos apresentaram atividade antibacteriana, entretanto, o extrato hexânico (EHB) apresentou desempenho superior, portanto realizou-se a caracterização química por CG-MS deste extrato. Interessantemente, o EHB apresentou maior atividade contra bactérias Gram-negativas, sendo *E. coli* O157:H7, a mais sensível (CBM 5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$). Entre as bactérias Gram-positivas, *S. aureus* (CBM 20 $\mu\text{L.mL}^{-1}$) foi a mais sensível. Os fitoesteróis representaram 51% do EHB, sendo gama-sitosterol o composto predominante, constituindo 22% do extrato.

Palavras-chave

Antibacterianos naturais, patógenos transmitidos por alimentos, butiá, composição química, fitoesteróis

1. Introdução

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) são um problema de saúde pública em todo o mundo (WHO, 2015). Em países industrializados, em torno de 30% das pessoas sofrem de alguma DTA a cada ano (Loizzo et al., 2010). Nos EUA foi estimado que 31 patógenos são responsáveis por 9,4 milhões de casos de DTA anualmente. Destes, 39% foram ocasionados por bactérias, sendo *Salmonella* spp. não tifoide e *Listeria monocytogenes* as que causaram mais mortes (Scallan et al., 2011). Na UE, em 2014, foram registrados 5.251 surtos transmitidos por alimentos, em 20% destes o agente etiológico foi

Salmonella e 16,1% foram causados por toxinas bacterianas (toxinas produzidas por *Bacillus*, *Clostridium* e *Staphylococcus*) (EFSA/ ECDC, 2015).

O controle de micro-organismos em alimentos tem sido obtido, principalmente, através da adição de produtos químicos sintéticos. Contudo, o uso destes agentes é limitado devido a algumas propriedades indesejáveis como carcinogenicidade, toxicidade e teratogenicidade (Faleiro, 2011). Consequentemente, o número de pesquisas voltadas a avaliação de compostos naturais que possam ser utilizados como uma alternativa aos conservantes sintéticos tem aumentado. Entre os antimicrobianos naturais que têm sido estudados, destacam-se compostos presentes em plantas, os quais têm apresentado efeito contra diversas bactérias patogênicas (Weerakkody, Caffin, Turner, & Dykes, 2010; Medina et al., 2011; Shen et al., 2014, Marques et al., 2015).

Nesse contexto, espécies da família Arecaceae são atrativas do ponto de vista químico (Silveira et al., 2005), sendo que o butiazeiro pertencente a esta família, é nativo do sul da América do Sul (Lorenzi, Noblick, Kahn, & Ferreira, 2010). Os seus frutos têm uma cor que varia do amarelo pálido ao vermelho brilhante, com um diâmetro médio de 1,7 a 4,2 cm (Hoffmann, Barbieri, Rombaldi, & Chaves, 2014), e são caracterizados por serem ricos em fenóis, carotenoides e ácido ascórbico (Beskow et al., 2015). Entretanto, embora sua ampla distribuição e seu potencial de utilização como bioconservante, este é o primeiro estudo no Brasil avaliando a atividade antimicrobiana do butiá, visando sua utilização na conservação de alimentos.

Dessa forma, o objetivo desse estudo foi produzir extratos de butiá com polaridades distintas, testar sua atividade antibacteriana contra bactérias patogênicas e caracterizar quimicamente o extrato com melhor desempenho.

2. Material e métodos

2.1 Preparação dos extratos de butiá

Os butiás foram obtidos de um pomar de pesquisa do Centro Agropecuário da Palma, UFPel, Pelotas, Brasil. Primeiramente, os frutos foram liofilizados inteiros e macerados. Preparou-se um extrato hexânico de butiá (apolar), denominado de EHB, e outro metanólico (polar), denominado de EMB, seguindo-se o método proposto por Shen et al. (2014). Para isso, adicionou-se 30 g do butiá liofilizado e 300 mL de hexano (ou metanol) (Synth[®]) em um erlenmeyer de 500 mL, o qual foi colocado em mesa agitadora por 2h (150 rpm) e, em seguida, em banho ultrassônico (48 A / 15 min). Após, o extrato foi filtrado em papel filtro, centrifugado por 20 min (7500 rpm) e o sobrenadante foi rotaevaporado (50 °C) até peso constante.

2.2 Micro-organismos testados e condições de cultivo

Foram utilizadas como alvo três bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e *Bacillus cereus* ATCC 11778) e três gram-negativas (*Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 12900 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442). Para a execução do experimento, as cepas

armazenadas a -80 °C foram repicadas em ágar Triptona de Soja (Acumedia®) adicionado de 0,6% de extrato de levedura (Himedia®) (TSA-YE), e incubadas a 37 °C por 24 h.

2.3. Atividade antibacteriana *in vitro*

2.3.1. Método de difusão em ágar

Seguiu-se a metodologia preconizada pelo CLSI (2015). O inóculo de cada micro-organismo alvo foi padronizado na concentração de 10^8 UFC.mL⁻¹, e espalhado em superfície de placas de Petri contendo ágar Mueller-Hinton (MH, Difco®). Após, foram colocados sobre o ágar, discos de papel filtro esterilizados (6 mm), impregnados com 20 µL de extrato de butiá, e as placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. A presença de halos de inibição ≥ 15 mm indicava sensibilidade da bactéria; 12-14 mm sensibilidade intermediária; e ≤ 11 mm, resistência (CLSI, 2015). Como controle positivo foram utilizados discos do antibiótico estreptomicina e, como controle negativo, discos de papel filtro esterilizados, impregnados com água destilada.

2.3.2. Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM)

A CIM foi determinada utilizando-se o método de diluição em tubos adaptado de Rota, Carramiñana, Burillo, & Herrera (2004). Testou-se as concentrações de 20, 18, 15, 12, 10, 7 e 5 µL.mL⁻¹ de extrato de butiá. Em tubos de ensaio contendo 1 mL de caldo MH, inoculou-se 10^5 UFC da bactéria alvo e o extrato na concentração predeterminada, incubando-se a 37 °C/24 h,

sob agitação (150 rpm). No extrato hexânico foi adicionado, também, duas gotas de Tween 80 (Vetec®), para facilitar a solubilidade. Como controle positivo, foi utilizado caldo MH e o inóculo na concentração de 10^5 UFC.mL⁻¹ e, como controle negativo, MH, o inóculo e estreptomicina (10 µg). Foi considerada como a CIM a menor concentração de composto onde não houve multiplicação celular visível no caldo de cultivo.

Após as 24h de incubação, dos tubos onde não ocorreu multiplicação celular visível, semeou-se 100 µL para placas de Petri contendo TSA-YE e incubou-se a 37 °C/24 h. A CBM foi a menor concentração de composto onde 99,9% das células inoculadas inicialmente foram mortas.

2.4 Caracterização química do extrato de butiá por CG-MS

Para o preparo da amostra, misturou-se 500 µL do extrato de butiá (100 µL.mL⁻¹ em clorofórmio grau HPLC) em 50 µL de 1-nonanol (5 mg.mL⁻¹ em clorofórmio grau HPLC) como padrão interno. Para separação e identificação dos compostos adaptou-se a metodologia proposta por Lisec et al. (2006). Utilizou-se equipamento Shimadzu GCMS QP2010 Ultra com auto injetor AOC-20i e biblioteca de espectro de massas NIST 2011. Injetou-se 1 µL de amostra com temperatura do injetor de 60 °C, e razão de *split* para injeção de 1:35. Utilizou-se hélio como gás carreador, com fluxo de 2,04 mL.min⁻¹ e velocidade linear como modo de controle de fluxo. A coluna capilar utilizada foi Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), com programação isotérmica por 3 min a 60 °C, rampa de temperatura de 15 °C por min até 300 °C, na qual permaneceu por 1 minuto, e aumentou-se 5 °C por min até 320 °C, permanecendo por 6 min. Para

os parâmetros de espectrometria de massas, as temperaturas da fonte de íons e interface foram de 250 °C, faixa de massa de 70 - 600 m/z e 0,2 escaneamentos por segundo.

2.5 Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$), com o auxílio do *software* STATISTICA versão 6.1 (StatSoft, França).

3. Resultados

3.1. Atividade antibacteriana

A avaliação qualitativa *in vitro* da atividade antibacteriana dos dois extratos produzidos (EHB e EMB), pelo método de difusão em ágar, mostrou que todas as bactérias testadas foram sensíveis a ambos os extratos (halos de inibição ≥ 15 mm). Com exceção de *L. monocytogenes*, houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre a atividade antibacteriana dos extratos, sendo que o EHB demonstrou uma atividade significativamente ($p \leq 0,05$) superior (Tabela 1).

A CIM do EHB variou de 5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (*E. coli* O157:H7) a 12 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (*S. Typhimurium* e *P. aeruginosa*). *L. monocytogenes* e *B. cereus* não foram inibidas nem na maior concentração testada (20 $\mu\text{L.mL}^{-1}$), porém, houve redução de 2 log UFC.mL⁻¹ de *L. monocytogenes* e de 3 log UFC.mL⁻¹ de *B. cereus*. A CBM do EHB foi de 20 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ para a maioria das bactérias

testadas, com exceção de *E. coli* O157:H7, onde a CBM foi de 5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (Tabela 2).

Já em relação ao EMB tanto a CIM como CBM variaram de 18 a 20 $\mu\text{L.mL}^{-1}$. *E. coli* O157:H7 e *B. cereus* não foram inibidas na maior concentração testada (20 $\mu\text{L.mL}^{-1}$).

3.2 Composição química do extrato de butiá

Dos 73 compostos presentes no EHB, foi possível identificar a classe de 56 (76,7%). Os fitoesteróis foram a classe majoritária, representando 51%, sendo que o γ -sitosterol foi o predominante com 22% (Figura 1). Hidrocarbonetos representaram 28%, ácidos graxos 7%, aldeídos 4% e ésteres 3%.

4. Discussão

Avaliou-se a atividade antibacteriana *in vitro* de dois extratos de butiá com polaridades distintas (EHB e EMB). Ambos apresentaram atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, entretanto, as bactérias testadas foram mais sensíveis ao EHB do que ao EMB, razão pela qual, realizou-se a análise de composição química apenas desse extrato.

As bactérias gram-negativas, *S. Typhimurium*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, foram mais sensíveis ao EHB do que as gram-positivas, *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *B. cereus*. Isso pode ser atribuído a diferenças na estrutura

celular entre bactérias gram-positivas e gram-negativas, o que resulta em comportamentos distintos quando os micro-organismos são expostos a agentes antimicrobianos (Puupponen-Pimia et al., 2001). Esse resultado é interessante, uma vez que normalmente as bactérias gram-positivas são mais sensíveis a antimicrobianos naturais, como extratos de plantas (Shan, Cai, Brooks, & Corke, 2007) e óleos essenciais (Chorianopoulos et al., 2004), do que bactérias gram-negativas. Isso ocorre devido as bactérias gram-negativas possuírem uma membrana externa composta de lipopolissacarídeo (LPS) na sua estrutura celular, que lhes confere proteção contra vários agentes (Tortora, Funke, & Case, 2012). A maior atividade antibacteriana do EHB (apolar) contra as bactérias gram-negativas pode ter ocorrido devido a sua afinidade com o LPS da membrana externa dessas bactérias.

A eficácia de um composto antimicrobiano depende do tipo de micro-organismo, bem como da espécie e cepa microbiana (Gould, 1989). Isso foi verificado nesse estudo, tendo em vista que a CBM do EHB para *E. coli* foi menor ($5 \mu\text{L.mL}^{-1}$) do que para as demais bactérias gram-negativas, *S. Typhimurium* e *P. aeruginosa* ($20 \mu\text{L.mL}^{-1}$). Da mesma forma, a CBM para *S. aureus* foi de $20 \mu\text{L.mL}^{-1}$, enquanto *B. cereus* e *L. monocytogenes*, também gram-positivas, não foram inibidas na maior concentração testada ($20 \mu\text{L.mL}^{-1}$). Contudo, é importante ressaltar que houve redução na concentração celular destes dois micro-organismos ($3 \log \text{UFC.mL}^{-1}$ para *B. cereus* e $2 \log \text{UFC.mL}^{-1}$ para *L. monocytogenes*) utilizando-se $20 \mu\text{L.mL}^{-1}$ de EHB.

E. coli O157:H7 foi a bactéria mais sensível ao EHB (CBM de $5 \mu\text{L.mL}^{-1}$). Esse resultado é digno de nota, tendo em vista que esse sorotipo de *E. coli* é um importante causador de surtos de DTA (Rangel et al., 2005), bem como,

apresenta elevado grau de severidade e baixa dose infectante (Farrokh et al., 2013).

Entre as bactérias gram-positivas, a mais sensível ao EHB foi *S. aureus*, o que é relevante, pois a intoxicação ocasionada por esse micro-organismo é uma das causas mais comuns de DTA (Bennett, 2005). Além disso, essa bactéria apresenta a capacidade de formar biofilme, o que pode torná-lo uma contaminação persistente no ambiente de processamento de alimentos (Herrera et al., 2007; Gutiérrez et al., 2012).

Em torno de 1.340 plantas apresentam atividade antimicrobiana comprovada (Tajkarimi, Ibrahim, & Cliver, 2010) e, nos últimos anos, estudos têm sido conduzidos no sentido de avaliar a atividade antimicrobiana de extratos de frutas. Alguns desses estudos foram realizados com frutas nativas do Brasil, entretanto, não há relato na literatura sobre a avaliação da atividade antimicrobiana de butiá, uma fruta com ampla distribuição no sul da América do Sul. Basile et al. (2005), por exemplo, verificaram que o extrato etanólico de guaraná (*Paullinia cupana* Mart.), em concentrações entre 16 e 128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, apresentou atividade contra bactérias gram-positivas, como *S. aureus* (CIM = 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), e gram-negativas, como *P. aeruginosa* e *E. coli* (CIM = 16 e 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente). Já Medina et al. (2011), avaliaram extratos de araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) e verificaram que estes apresentavam atividade antimicrobiana contra *Salmonella* Enteritidis, a qual variava de acordo com o tipo de extração (acetona ou água), e o tipo de fruto (araçá vermelho ou amarelo). Belda-Galbis et al. (2015) estudaram a atividade antimicrobiana de um extrato comercial de açaí contra *Listeria innocua*, e obtiveram uma CIM de 10 g.L^{-1} .

Muitos estudos têm relatado a atividade antimicrobiana de extratos de plantas contra diferentes micro-organismos, incluindo patógenos transmitidos por alimentos. Os resultados desses estudos são difíceis de comparar diretamente devido as diferentes metodologias utilizadas, incluindo solventes, concentrações e cepas microbianas testadas (Shan, Cai, Brooks, & Corke, 2007, Weerakkody, Caffin, Turner, & Dykes, 2010, Kallel et al., 2014). Além disso, as concentrações de extratos de plantas variam de acordo com a localização e variação sazonal (Yesil-Celiktas et al., 2007; Hussain, Anwar, Sherazi, & Przybylski, 2008).

Os fitoesteróis foram os compostos majoritários presentes no EHB (51%), os quais fazem parte da parede celular das plantas, onde desempenham função estrutural (Devaraj & Jialal, 2006; Marangoni & Poli, 2010). Esses compostos auxiliam na redução da absorção de colesterol (Thompon & Grundy, 2005), sendo considerados em alguns países como funcionais (Brasil, 2008).

Os fitoesteróis são da família dos triterpenos, com um anel tetracíclico e uma cadeia lateral ligada ao carbono 17 (Devaraj & Jialal, 2006). Os terpenos estão entre o grupo de compostos responsáveis pela atividade antimicrobiana das plantas (Lai & Roy, 2004). Isso sugere que o melhor desempenho antibacteriano do EHB em relação ao EMB, pode ter sido devido a presença desses compostos, que por sua característica apolar, foram extraídos com hexano e não com metanol.

Existem mais de 250 moléculas diferentes de fitoesterol, sendo o β -sitosterol o mais abundante (Fernandez & Vega-Lopez, 2005). Porém, no EHB

identificou-se apenas o γ -sitosterol. Embora os fitoesteróis tenham sido os compostos identificados em maior quantidade no EHB e seu potencial antimicrobiano seja relatado, ainda são necessários mais estudos para comprovar se foram os fitoesteróis os responsáveis pela atividade antibacteriana, se essa se deve aos demais compostos presentes em menor proporção, ou se há efeito sinérgico entre os componentes.

Os resultados obtidos nesse estudo indicam que o EHB tem potencial para ser utilizado como alternativa aos conservantes químicos sintéticos, haja vista que inibiu ou reduziu a concentração celular de bactérias que podem ser transmitidas por alimentos, causando DTA. Além de sua utilização direta em alimentos, o EHB poderia ser utilizado em filmes antimicrobianos para uso em embalagens de alimentos. Moradi, Tajik, Rohani, & Mahmoudian (2016), por exemplo, verificaram que o crescimento de *L. monocytogenes* e *E. coli* O157:H7 foi significativamente inibido em carne picada revestida com filmes comestíveis impregnados com óleo essencial de *Zataria multiflora* Boiss. nos 3 primeiros dias de armazenamento a 4 °C.

Esse estudo relata, pela primeira vez, a atividade antibacteriana de extrato de butiá, uma fruta muito popular no sul da América do Sul, com grande potencial científico e tecnológico, mas que ainda não possui uma produção comercial significativa (Hoffmann, Barbieri, Rombaldi, & Chaves, 2014). Destaca-se que ainda são necessários estudos para avaliar seu comportamento em sistemas alimentares e o mecanismo de ação antibacteriana do extrato, bem como, determinar qual/quais compostos presentes no extrato apresentaram a atividade antibacteriana e se essa atividade é individual ou sinérgica.

5. Conclusão

Os extratos hexânico (EHB) e metanólico (EMB) de butiá possuem atividade antibacteriana contra bactérias patogênicas, porém, o extrato hexânico possui atividade superior ao metanólico. O EHB, cuja fração majoritária é composta por fitoesteróis, tem potencial para ser utilizado como um agente bioconservante em alimentos, sendo necessários estudos para avaliar seu comportamento em sistemas alimentares.

Referências

- Basile, A., Ferrara, L., Del Pezzo, M., Mele, G., Sorbo, S., Bassi, P., & Montesano, D. (2005). Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. *Journal of Ethnopharmacology*, 102, 32-36.
- Belda-Galbis, C. M., Jimenez-Carreton, A., Pina-Perez, M. C., Martínez, A., & Rodrigo, D. (2015). Antimicrobial activity of açaí against *Listeria innocua*. *Food Control*, 53, 212-216.
- Bennett, R. W. (2005). Staphylococcal enterotoxin and its rapid identification in foods by enzyme-linked immunosorbent assay-based methodology. *Journal of Food Protection*, 68, 1264-1270.
- Beskow, G. T., Hoffmann, J. F., Teixeira, A. M., Fachinello, J. C., Chaves, F. C., & Rombaldi, C. V. (2015). Bioactive and yield potential of jelly palms (*Butia odorata* Barb. Rodr.). *Food Chemistry*, 172, 699–704.
- Brasil. (2008). Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde. Disponível em: http://anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm. Acesso em 20/01/2017

- Chorianopoulos, N., Kalpoutzakis, E., Aligiannis, N., Mitaku, S., Nychas, G.-J., & Haroutounian, S. A. (2004). Essential oils of *Satureja*, *Origanum*, and *Thymus* species: chemical composition and antibacterial activities against foodborne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 8261-8267.
- CLSI. (2015). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. CLSI document M100-S25.
- Devaraj S., & Jialal I. (2006). The role of dietary supplementation with plant sterols and stanols in the prevention of cardiovascular disease. *Nutrition Reviews*, 64, 348–54.
- EFSA/ECDC. (2015). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA Journal*, 13, 1-191.
- Faleiro, M. L. (2011). The mode of antibacterial action of essential oils. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*, 2, 1143-1156.
- Farrokh, C., Jordan, K., Auvray, F., Glass, K., Oppegaard, H., Raynaud, S., et al. (2013). Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. *International Journal of Food Microbiology*, 162, 190-212.
- Fernandez, M. L., & Vega-Lopez, S. (2005). Efficacy and safety of sitosterol in the management of blood cholesterol levels. *Cardiovascular Drug Reviews*, 23, 57-70.
- Gould, G. W. (1989). Introduction. *Mechanisms of action of food preservation procedures*, 1-42.

- Gutiérrez, D., Delgado, S., Vázquez-Sánchez, D., Martínez, B., Cabo, M. L., Rodríguez, A., Herrera, J. J., & García, P. (2012). Incidence of *Staphylococcus aureus* and analysis of associated bacterial communities on food industry surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 8547–8554.
- Hoffmann, J. F., Barbieri, R. L., Rombaldi, C. V., & Chaves, F. C. (2014) *Butia* spp. (Arecaceae): An overview. *Scientia Horticulturae*, 179, 122–131.
- Herrera, J. J. R., Cabo, M. L., González, A., Pazos, I., & Pastoriza, L. (2007). Adhesion and detachment kinetics of several strains of *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* under three different experimental conditions. *Food Microbiology* 24, 585–591.
- Hussain, A. I., Anwar, F., Sherazi, S. T. H., & Przybylski, R. (2008). Chemical composition, antioxidante and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chemistry*, 108, 986-995.
- Kallel, F., Driss, D., Chaari, F., Belghith, L., Bouaziz, F., Ghorbel, R., & Chaabouni, S. E. (2014). Garlic (*Allium sativum* L.) husk waste as a potential source of phenolic compounds: Influence of extracting solventes on its antimicrobial and antioxidant properties. *Industrial Crops and Products*, 62, 34-41.
- Lai, P., & Roy, J. (2004). Antimicrobial and chemopreventive properties of herbs and spices. *Current Medicinal Chemistry*, 11, 1451-1460.
- Lisec, J., Schauer, N., Kopka, J., Willmitzer, L., & Fernie, A. R. (2006). Gas chromatography mass spectrometry–based metabolite profiling in plants. *Nature protocols*, 1, 387–396.

- Loizzo, M. R., Tundis, R., Chandrika, U. G., Abeysekera, A. M., Menichini, F., & Frega, N. G. (2010). Antioxidant and antibacterial activities on food-borne pathogens of *Artocarpus heterophyllus* Lam. (Moraceae) leaves extracts. *Journal of Food Science*, 75, M291-M295.
- Lorenzi, H., Noblick, L., Kahn, F., & Ferreira, E. (2010). Flora Brasileira: Arecaceae (Palmeiras). Instituto Plantarum, Nova Odessa, p.367.
- Marangoni, F., & Poli, A. (2010). Phytosterols and cardiovascular health. *Pharmacological Research*, 61, 193-199.
- Marques, J. L., Volcão, L. M., Funck, G. D., Kroning, I., S., Silva, W. P., Fiorentini, A. M., Ribeiro, G. A. (2015). Antimicrobial activity of essential oils of *Origanum vulgare* L. and *Origanum majorana* L. against *Staphylococcus aureus* Isolated from poultry meat. *Industrial Crops and Products*, 77, 444–450.
- Medina, A. L., Haas, L. I. R., Chaves, F. C., Salvador, M., Zambiasi, R. C., Silva, W. P., Nora, L., & Rombaldi, C. V. (2011). Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. *Food Chemistry*, 128, 916-922.
- Moradi, M., Tajik, H., Rohani, S. M. R., & Mahmoudian, A. (2016). Antioxidant and antimicrobial effects of zein edible film impregnated with *Zataria multiflora* Boiss. essential oil and monolaurin. *LWT – Food Science and Technology*, 72, 37-43.
- Puupponen-Pimia, R., Nohynek, L., Meier, C., Kahkonen, M., Heinonen, M., Hopia, A., & Oksman-Caldentey, K. M. (2001). Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 494-507.

- Rangel, J. M., Sparling, P. H., Crowe, C., Griffin, P.M., & Swerdlow, D. L. (2005). Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerging Infectious Diseases*, 11, 603-609.
- Rota, C., Carramiñana, J. J., Burillo, J., & Herrera, A. (2004). In vitro antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against selected foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*, 67, 1252-1256.
- Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M., Roy, S. L., Jones, J. L., & Griffin, P. M. (2011). Foodborne Illness Acquired in the United States—Major Pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, 17, 7 – 15.
- Shan, B., Cai, Y. Z., Brooks, J. D., & Corke, H. (2007). The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology*, 117, 112–119
- Shen, X., Sun, X., Xie, Q., Liu, H., Zhao, Y., Pan, Y., Hwang, C., & Wu, V. C. H. (2014). Antimicrobial effect of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) extracts against the growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis. *Food Control*, 35, 159-165.
- Silveira, C. S., Pessanha, C. M., Lourenço, M. C. S., Neves Júnior, I., Menezes, F. S., & Kaplan, M. A. C. (2005). Antimicrobial activity of *Syagrus oleracea* and *Mauritia vinifera* fruits. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 15, 143–148.
- Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A., & Cliver, D. O. (2010). Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21, 1199-1218.
- Thompson, G. R., & Grundy, S. M. (2005). History and development of plant sterol and stanol esters for cholesterol-lowering purposes. *American Journal of Cardiology*, 96, 3D-9D.

Tortora, G. J, Funke, B. R, & Case, C. L. (2012). Microbiologia. Artmed, Porto Alegre, p.894.

Weerakkody, N. S., Caffin, N., Turner, M. S., & Dykes, G. A. (2010). In vitro antimicrobial activity of less-utilized spice and herb extracts against selected food-borne bacteria. *Food Control*, 21, 1408–1414.

WHO. (2015). WHO estimates of the global burden of foodborne diseases.

Disponível em:

http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/199350/1/9789241565165_eng.pdf /.

Acesso em 04/06/2016.

Yesil-Celiktas, O., Kocabas, E. E. H., Bedir, E., Sukan, F. V., Ozek, T., & Baser, K. H. C. (2007). Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry*, 100, 553-559.

Tabela 1 Zonas de inibição dos extratos hexânico (EHB) e metanólico (EMB) de butiá

Micro-organismo	Zonas de inibição (mm)	
	EHB	EMB
<i>P. aeruginosa</i>	64,0 ± 8,0 a	24,0 ± 1,0 b
<i>S. Typhimurium</i>	59,5 ± 4,5 a	24,0 ± 1,0 b
<i>E. coli</i> O157:H7	86,0 ± 2,0 a	24,0 ± 4,0 b
<i>L. monocytogenes</i>	30,5 ± 3,5 a	40,0 ± 4,0 a
<i>S. aureus</i>	45,0 ± 1,0 a	27,5 ± 1,5 b
<i>B. cereus</i>	42,0 ± 2,0 a	19,5 ± 2,5 b

Resultados expressos como médias ± Desvio Padrão (DP). Letras diferentes na linha representam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os extratos.

Tabela 2 Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM) dos extratos hexânico (EHB) e metanólico (EMB) de butiá

Micro-organismo	EHB		EMB	
	CIM ($\mu\text{L.mL}^{-1}$)	CBM ($\mu\text{L.mL}^{-1}$)	CIM ($\mu\text{L.mL}^{-1}$)	CBM ($\mu\text{L.mL}^{-1}$)
<i>P. aeruginosa</i>	12	20	20	20
<i>S. Typhimurium</i>	12	20	18	18
<i>E. coli</i> O157:H7	5	5	>20	>20
<i>L. monocytogenes</i>	>20	>20	20	20
<i>S. aureus</i>	10	20	18	18
<i>B. cereus</i>	>20	>20	>20	>20

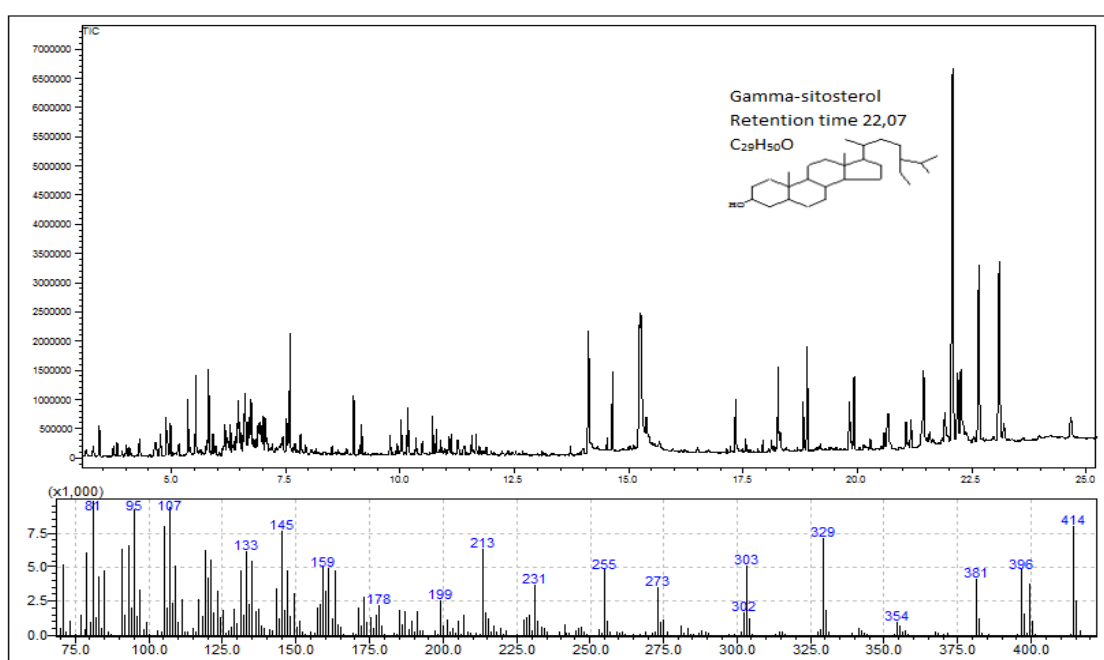


Figura 1 Cromatograma do extrato hexânico de butiá (EHB) e perfil de fragmentação do gama-sitosterol

4 Considerações finais

Os extratos hexânico e metanólico de butiá apresentaram atividade antibacteriana. O extrato hexânico apresentou atividade superior, sendo as bactérias Gram-negativas mais sensíveis ao extrato do que as Gram-positivas. *E. coli* O157:H7 foi a bactéria mais sensível. Os fitoesteróis foram o grupo de compostos predominante no extrato hexânico de butiá, sendo o gamasitosterol, o composto majoritário.

O extrato hexânico apresentou potencial para ser utilizado como bioconservante em alimentos, contudo, ainda são necessários outros estudos complementares sobre o seu mecanismo de ação e comportamento em sistemas alimentares.

Referências

ALLERBERGER, F.; WAGNER, M. Listeriosis: a resurgent foodborne infection. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, p. 16 – 23, 2010.

AMANI, J.; AHMADPOUR, A.; IMANI FOOLADI, A. A.; NAZARIAN, S. Detection of *E. coli* O157:H7 and *Shigella dysenteriae* toxins in clinical samples by PCR – ELISA. **Brazilian Journal of Infectious Disease**, v. 19, p. 278 – 284, 2015.

ARGUDIN, M. A.; MENDOZA, M. C.; RODICIO, M. R. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. **Toxins**, v. 2, p. 1751 – 1773, 2010.

BAJPAI, V. K.; BAEK, K. H.; KANG, S. C. Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review. **Food Research International**, v. 45, p. 722-734, 2012.

BASILE, A.; FERRARA, L.; DEL PEZZO, M.; MELE, G.; SORBO, S.; BASSI, P.; MONTESANO, D. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, p. 32-36, 2005.

BEECHER, D. J.; SCHOENI, J. L.; WONG, A. C. Enterotoxic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. **Infection and Immunity**, v. 63, p. 4423 – 4428, 1995.

BELDA-GALBIS, C. M.; JIMENEZ-CARRETON, A.; PINA-PEREZ, M. C.; MARTÍNEZ, A.; RODRIGO, D. Antimicrobial activity of açaí against *Listeria innocua*. **Food Control**, v. 53, p. 212-216, 2015.

BENNETT, R. W. Staphylococcal enterotoxin and its rapid identification in foods by enzyme-linked immunosorbent assay-based methodology. **Journal of Food Protection** v. 68, p. 1264-1270, 2005.

BESKOW, G. T.; HOFFMANN, J. F.; TEIXEIRA, A. M.; FACHINELLO, J. C.; CHAVES, F. C.; ROMBALDI, C. V. Bioactive and yield potential of jelly palms (*Butia odorata* Barb. Rodr.). **Food Chemistry**, v. 172, p. 699–704, 2015.

BORRIS, R. P. Natural product research: perspectives from a major pharmaceutical company. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 51, p. 29-38, 1996.

BOULEKBACHE-MAKHLOUF, L.; SLIMANI, S.; MADANI, K. Total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities of fruits of *Eucalyptus globulus* cultivated in Algeria. **Industrial Crops and Products**, v. 41, p. 85-89, 2013.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2008. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde**. Disponível em: <http://anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em: 20 jan. 2017

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010. **Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos**. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_integrado_vigilancia_doencas_alimentos.pdf>. Acesso em: 10 ago. 2016.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016. **Surtos de doenças transmitidas por alimentos**. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/junho/08/Apresenta----o-Surtos-DTA-2016.pdf>>. Acesso em: 10 ago. 2016.

BUCHANAN, A. Foodborne disease significance of *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *E. coli*. **Food Technology**, v. 51, p. 69 – 76, 1997.

BURT, S. Essential oils and their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 233-253, 2004.

CATHCART, G. R.; GILMORE, B. F.; GREER, B.; HARRIOTT, P.; WALKER, B. Inhibitor profiling of the *Pseudomonas aeruginosa* virulence factor LasB using N-alpha mercaptoamide template-based inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, p. 6230 – 6232, 2009.

CHORIANOPOULOS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; ALIGIANNIS, N.; MITAKU, S.; NYCHAS, G. J.; HAROUTOUNIAN, S. A. Essential oils of *Satureja*, *Origanum*, and *Thymus* species: chemical composition and antibacterial activities against foodborne pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 8261-8267, 2004.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement**. CLSI document M100-S25, 2015.

CÔTÉ, J.; CAILLET, S.; DOYON, G.; DUSSAULT, D.; SYLVAIN, J-F.; LACROIX, M. Antimicrobial effect of cranberry juice and extracts. **Food Control**, v. 22, p. 1413-1418, 2011.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Review**, v. 12, p. 564-582, 1999.

DANNENBERG, G. S.; FUNCK, G. D.; MATTEI, F. J.; SILVA, W. P.; FIORENTINI, A. M. Antimicrobial and antioxidant activity of essential oil from pink pepper tree (*Schinus terebinthifolius* Raddi) *in vitro* and in cheese experimentally contaminated with *Listeria monocytogenes*. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 36, p. 120-127, 2016.

DEVARAJ, S.; JIALAL I. The role of dietary supplementation with plant sterols and stanols in the prevention of cardiovascular disease. **Nutrition Reviews**, v. 64, p. 348–54, 2006.

EFSA (European Food Safety Authority); ECDC (European Centre For Disease Prevention and Control). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. **EFSA Journal**, v. 13, 191 pp., 2015.

FALEIRO, Maria L. The mode of antibacterial action of essential oils. In: MENDEZ-VILAZ, Antonio. (Org.). **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**. Badajoz: Formatex Research Center, 2011. p. 1143-1156.

FARBER, J. M.; PETERKIN, P. I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbial Reviews**, v. 55, p. 476 – 511, 1991.

FARROKH, C.; JORDAN, K.; AUVRAY, F.; GLASS, K.; OPPEGAARD, H.; RAYNAUD, S.; THEVENOT, D.; CONDRON, R.; REU, K.D.; GOVARIS, A.; HEGGUM, K.; HEYNDRIKX, M.; HUMMERJOHANN, J.; LINDSAY, D.; MISZCZYCHA, S.; MOUSSIEGT, S.; VERSTRAETE, K.; CERF, O. Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 162, 190-212, 2013.

FERNANDES, M. R. V.; DIAS, A. L. T.; CARVALHO, R. R.; SOUZA, C. R. F.; OLIVEIRA, W. P. Antioxidant and antimicrobial activities of *Psidium guajava* L. spray dried extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 60, p. 39-44, 2014.

FERNANDEZ, M. L.; VEGA-LOPEZ, S. Efficacy and safety of sitosterol in the management of blood cholesterol levels. **Cardiovascular Drug Reviews**, v. 23, p. 57-70, 2005.

FERRÃO, T. S.; FERREIRA, D. F.; FLORES, D. W.; BERNARDI, G.; LINK, D.; BARIN, J. S.; WAGNER, R. Evaluation of composition and quality parameters of jelly palm (*Butia odorata*) fruits from different regions of Southern Brazil. **Food Research International**, v. 54, p. 57 – 62, 2013.

FORSYTHE, Stephen J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 607p.

FOULADKHAH, A.; GEORNARAS, I.; SOFOS, J. N. Biofilm formation of O157 and non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* and multidrug-resistant and susceptible *Salmonella* Typhimurium and Newport and their inactivation by sanitizers. **Journal of Food Science**, v. 78, p. 880 – 886, 2013.

GOULD, Grahame Warwick. Introduction. In: GOULD, Grahame Warwick. (Org.). **Mechanisms of action of food preservation procedures**. London: Elsevier Applied Science, 1989. p. 1-42.

GRANUM, P. E.; LUND, T. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. **FEMS Microbiology Letters**, v. 157, p. 223 – 228, 1997.

GRIMONT, Patrick A. D.; WEILL, François-Xavier. **Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars**: World Health Organization collaborating centre for reference and research on *Salmonella*. Paris: Institute Pasteur, 2007. 167 p.

GUTIÉRREZ, D.; DELGADO, S.; VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D.; MARTÍNEZ, B.; CABO, M. L.; RODRÍGUEZ, A.; HERRERA, J. J.; GARCÍA, P. Incidence of *Staphylococcus aureus* and analysis of associated bacterial communities on food industry surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, p. 8547–8554, 2012.

GUTIERREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components. **Food Microbiology**, v. 26, p. 142-150, 2009.

HENDERSON, A.; GALEANO, G.; BERNAL, R. **A field guide to the palms of the Americas**. Princeton: Princeton University Press, 1995. 376p.

HENNEKINNE, J. A.; OSTYN, A.; GUILLIER, F.; HERBIN, S.; PRUFER, A. L.; DRAGACCI, S. How should staphylococcal food poisoning outbreaks be characterized? **Toxins**, v. 2, p. 2106 – 2116, 2010.

HERRERA, J. J. R.; CABO, M. L.; GONZÁLEZ, A.; PAZOS, I.; PASTORIZA, L. Adhesion and detachment kinetics of several strains of *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* under three different experimental conditions. **Food Microbiology**, v. 24, p. 585–591, 2007.

HEYNDRICKX, Marc; SCHELDEMAN, Patsy. Bacilli associated with spoilage in dairy and other foods products. In: BERKELEY, Roger; HEYNDRICKX, Marc; LOGAN, Niall; DE VOS, Paul. (Org.). **Applications and Systematics of Bacillus and relatives**. Oxford: Blackwell Science, 2002. p. 64 – 82.

HOFFMANN, J. F.; BARBIERI, R. L.; ROMBALDI, C. V.; CHAVES, F. C. *Butia* spp. (Arecaceae): An overview. **Scientia Horticulturae**, v. 179, p. 122–131, 2014.

HUSSAIN, A. I.; ANWAR, F.; SHERAZI, S. T. H.; PRZYBYLZKI, R. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. **Food Chemistry**, v. 108, p. 986-995, 2008.

ISSENHUTH-JEANJEAN, S.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; GUIBOURDENCHE, M.; de PINNA, E.; NAIR, S.; FIELDS, P. I.; WEILL, F. X. Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, v. 165, p. 526 – 530, 2014.

KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 813-829, 2003.

KALLEL, F.; DRISS, D.; CHAARI, F.; BELGHITH, L.; BOUAZIZ, F.; GHORBEL, R.; CHAABOUNI, S. E. Garlic (*Allium sativum* L.) husk waste as a potential source of phenolic compounds: Influence of extracting solvents on its antimicrobial and antioxidant properties. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 34-41, 2014.

KTSOYAN, Z.; GHAZARYAN, K.; MANUKYAN, G.; MARTIROSYAN, A.; MNATSAKANYAN, A.; ARAKELOVA, K.; GEVORGYAN, Z.; SEDRAKYAN, A.; ASOYAN, A.; BOYAJYAN, A.; AMINOV, R. Inflammatory Responses to *Salmonella* Infections Are Serotype-Specific. **International Journal of Bacteriology**, v. 2013, p. 1 – 7, 2013.

LAI, P.; ROY, J. Antimicrobial and chemopreventive properties of herbs and spices. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 1451-1460, 2004.

LI, M.; MUTHAIYAN, A.; O'BRYAN, C. A.; GUSTAFSON, J. E.; LI, Y.; CRANDALL, P. G.; RICKE, S. C. Use of natural antimicrobials from a food safety perspective for control of *Staphylococcus aureus*. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 12, p. 1240-1254, 2011.

LISEC, J.; SCHAUER, N.; KOPKA, J.; WILLMITZER, L.; FERNIE, A. R. Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. **Nature Protocols**, v. 1, p. 387–396, 2006.

LOIZZO, M. R.; TUNDIS, R.; CHANDRIKA, U. G.; ABEYSEKERA, A. M.; MENICHINI, F.; FREGA, N. G. Antioxidant and antibacterial activities on food-borne pathogens of *Artocarpus heterophyllus* Lam. (Moraceae) leaves extracts. **Journal of Food Science** v. 75, p. M291-M295, 2010.

LORENZI, H. J.; SOUZA, H. M.; CERQUEIRA, L. S. C.; COSTA, J. T. M.; FERREIRA, C. **Palmeiras brasileiras - exóticas e cultivadas**. 1.ed. Nova Odessa: Plantarum, 2004. 416p.

LORENZI, H. J.; NOBLICK, L.; KAHN, F.; FERREIRA, E. **Flora Brasileira: Arecaceae (Palmeiras)**. 1.ed. Nova Odessa: Plantarum, 2010. 384p.

MAJOWICZ, S.; MUSTO, J.; SCALLAN, E.; ANGULO, F.; KIRK, M.; O'BRIEN, S.; JONES, T.; FAZIL, A.; HOEKSTRA, R. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. **Clinical Infectious Disease**, v. 50, p. 882 – 889, 2010.

MARANGONI, F.; POLI, A. Phytosterols and cardiovascular health. **Pharmacological Research**, v. 61, p. 193-199, 2010.

MARQUES, J. L.; VOLCÃO, L. M.; FUNCK, G. D.; KRONING, I. S.; SILVA, W. P.; FIORENTINI, A. M.; RIBEIRO, G. A. Antimicrobial activity of essential oils of *Origanum vulgare* L. and *Origanum majorana* L. against *Staphylococcus aureus*

isolated from poultry meat. **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 444–450, 2015.

MEAD, G.; LAMMERDING, A.; COX, N.; DOYLE, M.; HUMBERT, F.; KULIKOVSKIY, A.; PANIN, A.; NASCIMENTO, V.; WIERUP, M.; BIGGS, R.; BUHR, R.; CAHILL, S.; CASON Jr, J.; CHALERMCHAKIT, T.; FILHO, R.; FORSHELL, L.; HIDALGO, H.; HOFACRE, C.; HUPKES, H.; LANDINEZ, M.; MADSEN, M.; MULDER, R.; RICHARDSON, L.; SHI, Z.; SMITH, D.; TOYOFUKU, H.; TUOMINEN, P.; UYTENDAELE, M.; ZWIETERING, M. Scientific and technical factors affecting the setting of salmonella criteria for raw poultry: a global perspective. **Journal of Food Protection**, v. 73, p. 1566 – 1590, 2010.

MEDINA, A. L.; HAAS, L. I. R.; CHAVES, F. C.; SALVADOR, M.; ZAMBIAZI, R. C.; SILVA, W. P.; NORA, L.; ROMBALDI, C. V. Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. **Food Chemistry**, v. 128, p. 916-922, 2011.

MORADI, M.; TAJIK, H.; ROHANI, S. M. R.; MAHMOUDIAN, A. Antioxidant and antimicrobial effects of zein edible film impregnated with *Zataria multiflora* Boiss. essential oil and monolaurin. **LWT - Food Science and Technology**, v. 72, p. 37-43, 2016.

MORRISON, A. J.; WENZEL, R. P. Epidemiology of infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. **Reviews of Infectious Disease**, v. 6, p. 627 – 642, 1984.

NEGI, P. S. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. **International Journal of Food Microbiology**, v. 156, p. 7-17, 2012.

NOORDHOUT, C. M.; DEVELEESSCHAUWER, B.; ANGULO, F. J.; VERBEKE, G.; HAAGSMA, J.; KIRK, M.; HAVELAAR, A.; SPEYBROECK, N. The global burden of listeriosis: A systematic review and meta-analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 14, p. 1073 – 1082, 2014.

PAINTER, J. A.; HOEKSTRA, R. M.; AYERS, T.; TAUXE, R. V.; BRADEN, C. R.; ANGULO, F. J.; GRIFFIN, P. M. Attribution of Foodborne Illnesses, Hospitalizations, and Deaths to Food Commodities by using Outbreak Data, United States, 1998–2008. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, p. 407 – 415, 2013.

PAUL, D.; STEELE, C.; DONALDSON, J. R.; BANES, M. M.; KUMAR, R.; BRIDGES, S. M.; ARICK II, M.; LAWRENCE, M. L. Genome comparison of *Listeria monocytogenes* serotype 4a strain HCC23 with selected lineage I and lineage II *L. monocytogenes* strains and other *Listeria* strains. **Genomics Data**, v. 2, p. 219 – 225, 2014.

PUUPPONEN-PIMIA, R.; NOHYNEK, L.; MEIER, C.; KAHKONEN, M.; HEINONEN, M.; HOPIA, A.; OKSMAN-CALDENTY, K. M. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 494-507, 2001.

RAJKOVIC, A.; UYTENDAELE, M.; VERMEULEN, A.; ANDJELKOVIC, M.; FITZ-JAMES, I.; in't VELD, P.; DENON, Q.; VÉRHE, R.; DEBEVERE, J. Heat resistance of *Bacillus cereus* emetic toxin, cereulide. **Letters in Applied Microbiology**, v. 46, p. 536 – 541, 2008.

RAJKOWSKI, Kathleen T. Biofilms in fish processing. In: FRATAMICO, Pina M.; ANNOUS, Bassam A.; GUNTHER, Nereus W. (Org.). **Biofilms in the food and beverage industries**. Waltham: Woodhead Publishing, 2009. p. 499 – 516.

RANGEL, J. M.; SPARLING, P. H.; CROWE, C.; GRIFFIN, P. M.; SWERDLOW, D. L. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, p. 603-609, 2005.

REHM, Bernd H. A. Alginate production: precursor biosynthesis, polymerization and secretion. In: REHM, Bernd H. A. (Org.). **Alginates: Biology and applications**. Berlin Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009. p. 55 – 71.

ROSA, L.; CASTELLANI, T. T.; REIS, A. Biologia reprodutiva de *Butia capitata* (Martius) Beccari var. *odorata* (Palmae) na restinga do município de Laguna, SC. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 21, p. 281 – 287, 1998.

ROTA, C.; CARRAMIÑANA, J. J.; BURILLO, J.; HERRERA, A. *In vitro* antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against selected foodborne pathogens. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 1252-1256, 2004.

SAVOIA, D. Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. **Future Microbiology**, v. 7, p. 979-990, 2012.

SCALLAN, E.; HOEKSTRA, R. M.; ANGULO, F. J.; TAUXE, R. V.; WIDDOWSON, M.; ROY, S. L.; JONES, J. L.; GRIFFIN, P. M. Foodborne Illness Acquired in the United States—Major Pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, p. 7 – 15, 2011.

SCHELDEMAN, P.; HERMAN, L.; FOSTER, S.; HEYNDRICKX, M. *Bacillus sporothermodurans* and other highly heat-resistant spore formers in milk. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, p. 542 – 555, 2006.

SCHWARTZ, E.; FACHINELLO, J. C.; BARBIERI, R. L.; SILVA, J. B. Avaliação da população de *Butia capitata* de Santa Vitória do Palmar. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, p. 736 - 745, 2010.

SHAN, B.; CAI, Y. Z.; BROOKS, J. D.; CORKE, H. The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. **International Journal of Food Microbiology**, v. 117, p. 112–119, 2007.

SHEN, X.; SUN, X.; XIE, Q.; LIU, H.; ZHAO, Y.; PAN, Y.; HWANG, C.; WU, V. C. H. Antimicrobial effect of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) extracts against the growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis. **Food Control**, v. 35, p. 159-165, 2014.

SILVEIRA, C. S.; PESSANHA, C. M.; LOURENÇO, M. C. S.; NEVES JÚNIOR, I.; MENEZES, F. S.; KAPLAN, M. A. C. Antimicrobial activity of *Syagrus oleracea* and *Mauritia vinifera* fruits. **Brazilian Journal of Pharmacy**, v. 15, p. 143–148, 2005.

SOFOS, J. N.; BEUCHAT, L. R.; DAVIDSON, P. M.; JOHNSON, E. A. Naturally occurring antimicrobials in food. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 28, p. 71-72, 1998.

STEWART, P. S.; COSTERTON, J. W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. **The Lancet**, v. 358, p. 135 – 138, 2001.

TAJKARIMI, M. M.; IBRAHIM, S. A.; CLIVER, D. O. Antimicrobial herb and spice compounds in food. **Food Control**, v. 21, p. 1199-1218, 2010.

THOMPSON, G. R.; GRUNDY, S. M. History and development of plant sterol and stanol esters for cholesterol-lowering purposes. **American Journal of Cardiology**, v. 96, p. 3D-9D, 2005.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L.. **Microbiologia**. 10.ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 894 p.

WALKER, S. J.; ARCHER, P.; BANKS, J. G. Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 68, p. 157 – 162, 1990.

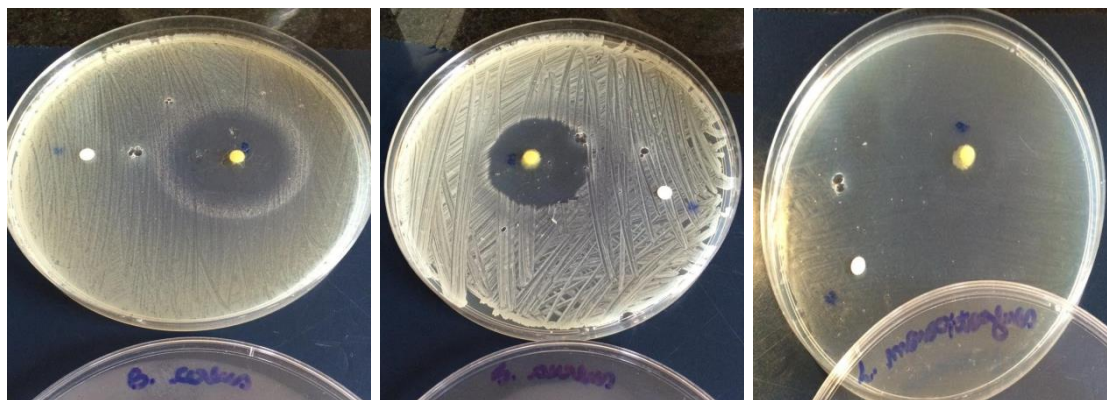
WEERAKKODY, N. S.; CAFFIN, N.; TURNER, M. S.; DYKES, G. A. *In vitro* antimicrobial activity of less-utilized spice and herb extracts against selected food-borne bacteria. **Food Control**, v. 21, p. 1408–1414, 2010.

WHO (World Health Organization), 2015. **WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015**. Disponível em:
<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/199350/1/9789241565165_eng.pdf.>
Acesso em: 12 ago. 2016.

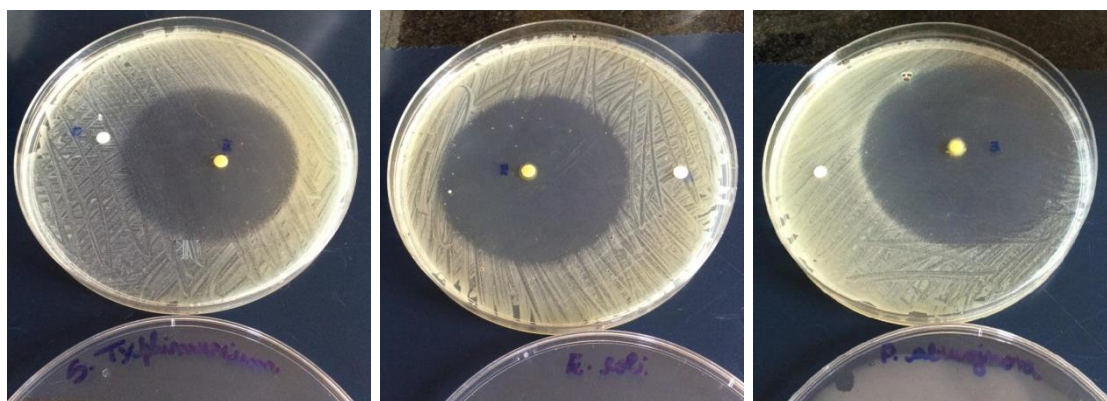
YESIL-CELIK TAS, O.; KOCABAS, E. E. H.; BEDIR, E.; SUKAN, F. V.; OZEK, T.; BASER, K. H. C. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. **Food Chemistry**, v. 100, p. 553-559, 2007.

Apêndices

Apêndice A – Fotos do teste de difusão em ágar do extrato hexânico de butiá



Teste de difusão em ágar para *B. cereus*, *S. aureus* e *L. monocytogenes*



Teste de disco difusão para *S. Typhimurium*, *E. coli* e *P. aeruginosa*

Apêndice B – Caracterização química do extrato hexânico de butiá por CG-MS

A	B	C	D	E	F	G	H	I
Peak number	Retention time	Name compound	Molecular weigh	% similarity - NIST11	Index retention time (alcanos)	Index retention time (FAME)	% composto	Classe
1	3.132	aldehyde	98		816	428	0,2765138	Aldehyde
2	3.290	NI			829	443	0,42810423	NI
3	3.420	n,n -dimethyl benzene	106	98	840	455	1,35432322	Hydrocarbon
4	5.812	3,3-dimethyl-1,4-Pentadiene	96	95	1033	683	2,90422139	Hydrocarbon
5	5.966	NI			1058	712	0,34004088	NI
6	5.967	NI*			1062	717	0,340043	NI
7	5.968	NI			1065	720	0,34004512	NI
8	5.969	NI			1071	728	0,34004724	NI
9	7.207	hydrocarbon			1145	815	0,2226584	Hydrocarbon
10	7.699	hydrocarbon			1185	862	0,29761603	Hydrocarbon
11	8.506	1H-Indene, 2,3-dihydro-4,7-dimethyl-			1264	939	0,29332799	Hydrocarbon
12	8.816	pentamethyl-Benzene	148	94	1296	968	0,15727921	Hydrocarbon
13	8.850	NI			1299	971	0,15804951	NI
14	9.113	NI			1326	996	0,31561269	NI
15	9.782	biphenyl	154	95	1395	1072	0,7563083	Hydrocarbon
16	9.837	NI			1400	1078	0,08349028	NI
17	9.924	n-alkyl-naphthalene	156	96	1411	1088	0,27468182	Hydrocarbon
18	9.962	n-alkyl-naphthalene	168	86	1415	1092	0,26499531	Hydrocarbon
19	10.378	n-alkyl-naphthalene	156	86	1465	1139	0,17174329	Hydrocarbon
20	10.487	n-alkyl-naphthalene	156	93	1478	1152	0,45690311	Hydrocarbon
21	10.887	n-alkyl-naphthalene	170	88	1526	1197	0,45177907	Hydrocarbon
22	10.985	n-alkyl-naphthalene	170	92	1538	1209	0,13078275	Hydrocarbon
23	11.070	n-alkyl-naphthalene	170	95	1548	1220	0,5455916	Hydrocarbon
24	11.113	n-alkyl-naphthalene	170	95	1553	1226	0,69937214	Hydrocarbon
25	11.253	hydrocarbon	170		1570	1244	0,24851807	Hydrocarbon
26	11.274	hydrocarbon	170		1572	1246	0,25333695	Hydrocarbon
27	11.389	hydrocarbon	170		1586	1261	0,22855169	Hydrocarbon
28	11.416	hydrocarbon	170		1589	1265	0,12034713	Hydrocarbon
29	11.457	2,2'-Dimethylbiphenyl	182	85	1594	1270	0,08110203	Hydrocarbon
30	11.543	hydrocarbon	182		1605	1281	0,24605564	Hydrocarbon
31	11.573	3,3'-Dimethylbiphenyl	182	93	1609	1285	0,55094451	Hydrocarbon

A	B	C	D	E	F	G	H	I
32	11.660	n,n-dimethyl-1,1'-Biphenyl	182	95	1621	1296	0,64589501	Hydrocarbon
33	11.728	n,n-dimethyl-1,1'-Biphenyl	182	90	1630	1305	0,38274969	Hydrocarbon
34	11.792	NI			1638	1313	0,14597581	NI
35	11.839	NI			1645	1319	0,09091675	NI
36	11.883	n,n-Dimethylbiphenyl	182		1651	1325	0,32363463	Hydrocarbon
37	12.059	Chamazulene	184	90	1675	1347	0,08608832	Hydrocarbon
38	12.230	NI	184		1697	1369	0,12079321	NI
39	12.684	NI			1758	1431	0,13441599	NI
40	13.106	Anthracene	178	97	1817	1491	0,15011869	Hydrocarbon
41	13.725	hydrocarbon	254		1909	1579	0,32430533	Hydrocarbon
42	13.871	methyl ester hexadecanoic acid (hidrocarboneto)	270	88	1931	1600	0,05000919	Hydrocarbon
43	13.901	2-methyl-Anthracene	192	92	1935	1605	0,06771976	Hydrocarbon
44	13.944	9-methyl-Anthracene	192	89	1942	1612	0,09356777	Hydrocarbon
45	13.985	cis-9-Hexadecenoic acid (Palmitoleic acid)	254	91	1948	1618	0,13962374	Fatty acid
46	14.119	Hexadecanoic acid	256	92	1968	1639	5,32149792	Fatty acid
47	15.028	hydrocarbon			2113	1782	0,12389454	Hydrocarbon
48	15.238	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-	280	93	2147	1816	1,81331261	Fatty acid
49	15.260	hydrocarbon	282		2151	1820	1,19293821	Hydrocarbon
50	15.381	ethyl ester Linoleic acid	308	92	2171	1841	0,57975187	Ester
51	17.332	2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethyl ester Hexadecanoic acid,	330	91	2525	2190	2,08502236	Ester
52	17.553	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	390	96	2567	2233	0,44210634	Ester
53	17.929	hydrocarbon			2643	2309	0,44772095	Hydrocarbon
54	18.262	hydrocarbon			2712	2375	3,57435493	Hydrocarbon
55	18.305	hydrocarbon			2720	2383	0,40854472	Hydrocarbon
56	18.811	aldehyde			2825	2485	1,96470278	Aldehyde
57	18.897	hydrocarbon			2844	2502	4,86259541	Hydrocarbon
58	19.820	aldehyde			3030	2687	1,9753323	Aldehyde
59	19.922	hydrocarbon	282		3048	2708	3,31744514	Hydrocarbon
60	20.277	hydrocarbon	410		3108	2779	0,53381669	Hydrocarbon
61	20.583	NI			3161	2840	0,67475852	NI
62	20.672	NI			3176	2858	0,70044336	NI
63	21.442	phytosterol	400		3294	3012	3,05634795	phytosterol
64	21.575	hydrocarbon	410		3314	3038	0,46776574	Hydrocarbon
65	21.906	phytosterol	426		3363	3105	1,09636658	Phytosterol

A	B	C	D	E	F	G	H	I
66	22.078	gamma-sitosterol	414	91	3389	3139	21,6478341	Phytosterol
67	22.189	phytosterol			3405	3162	3,20683538	Phytosterol
68	22.258	phytosterol			3414	3175	2,83196882	Phytosterol
69	22.541	NI			3452	3232	0,33133658	NI
70	22.650	phytosterol			3467	3254	9,69496153	Phytosterol
71	23.093	phytosterol			3526	3343	9,84424317	Phytosterol
72	23.199	NI			3541	3364	0,68303476	NI
73	24.663	NI			3738	3657	1,03354411	NI
		NI: NOT IDENTIFIED						