

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**RELAÇÃO ENTRE SALMONELAS ISOLADAS DE ALIMENTOS E  
EXTRATOS DE PLANTAS CONDIMENTARES, NA PERSPECTIVA DE  
ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E PREDITIVIDADE DIAGNÓSTICA.**

**Giovani Girolometto**

Porto Alegre

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**RELAÇÃO ENTRE SALMONELAS ISOLADAS DE ALIMENTOS E  
EXTRATOS DE PLANTAS CONDIMENTARES, NA PERSPECTIVA DE  
ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E PREDITIVIDADE DIAGNÓSTICA**

Giovani Girolometto

**Tese apresentada como requisito parcial  
para obtenção de grau de Doutor em  
Ciências Veterinárias, na especialidade  
de Epidemiologia, Saneamento e  
Profilaxia.**

**Orientador: Prof. Dr. José Maria Wiest**

**Porto Alegre**

**2014**

CIP - Catalogação na Publicação

Girolometto, Giovani  
RELAÇÃO ENTRE SALMONELAS ISOLADAS DE ALIMENTOS E  
EXTRATOS DE PLANTAS CONDIMENTARES, NA PERSPECTIVA DE  
ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E PREDITIVIDADE DIAGNÓSTICA.  
/ Giovani Girolometto. -- 2014.  
113 f.

Orientador: José Maria Wiest.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre,  
BR-RS, 2014.

1. atividade antibacteriana. 2. Salmonella spp.  
3. Sensibilidade diagnóstica.. 4. Artemisia  
dracunculus . 5. Origanum vulgare . I. Wiest, José  
Maria, orient. II. Título.

Giovani Girolometto

**RELAÇÃO ENTRE SALMONELAS ISOLADAS DE ALIMENTOS E  
EXTRATOS DE PLANTAS CONDIMENTARES, NA PERSPECTIVA DE  
ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E PREDITIVIDADE DIAGNÓSTICA**

Aprovado em 30 de abril de 2014.

Aprovado por:

---

Prof. Dr. José Maria Wiest

Orientador e Presidente da Comissão

---

Prof. Dr. César Augusto Marchionatti Avancini

Membro da Comissão

---

Prof. Dr. Luiz Filipe Damé Shuch

Membro da Comissão

---

Prof. Dra. Ingrid Bergman Inchausti de Barros

Membro da Comissão

A Carina e Amanda pelo amor e companheirismo.

Aos meus pais que sempre me apoiaram com tanto amor e compreensão.

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor e orientador José Maria Wiest, por toda a confiança e amizade.

Aos amigos do Sítio Capororoca que criaram o espaço para desenvolver minhas plantinhas.

Aos colegas do Laboratório de Higiene de Alimentos, pela companhia e bons momentos.

As amigas Fabiana e Aline por ajudarem muito no desenvolvimento do projeto.

Ao CEVS e especialmente à Denise Maria da Silva Figueiredo pelo acesso e auxílio aos dados da Vigilância epidemiológica.

Aos funcionários do IPB-LACEN/RS especialmente a Jane Mari Corrêa Both, pelo material e ajuda nos procedimentos usados no trabalho.

Aos Amigos Ernani e Jussara e minha afilhada Anita, por me acolherem com tanto carinho e darem a força necessária no início do doutorado.

Ao CNPq, pelo financiamento que viabilizou este estudo.

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo espaço e estrutura de trabalho e convívio acadêmico.

*Um amor, uma carreira, uma revolução: outras tantas coisas que se começam  
sem saber como acabarão.*

*Jean-Paul Sartre*

## RESUMO

As bactérias do gênero *Salmonella* são, atualmente, uma grande preocupação pela alta incidência de casos registrados, e um sério problema de saúde pública, pela severidade do processo infeccioso. Em função disto os protocolos de controle e legislações em vigilância em saúde obrigam a ausência total de *Salmonella* em alimento. Para garantir a segurança do alimento, uma crescente demanda de produtos naturais vem sendo estudada para controlar os patógenos alimentares. As plantas condimentares historicamente vêm sendo usadas para conferir sensorialidade aos alimentos, porém muitos desses recursos naturais possuem propriedades antimicrobianas. No entanto, pouco se sabe sobre a interação que essas especiarias influem sobre esses patógenos. Este estudo foi dividido em duas partes. Na primeira, através de testes de diluição em sistemas de tubos múltiplos, determinou-se a Intensidade de Atividade e Inibição Bacteriana (IINIB) e a Intensidade de Atividade e Inativação Bacteriana (IINAB) de diferentes extratos de *Artemisia dracuncululus* L. (“estragão”) e *Origanum vulgare* L. (“orégano”) frente a oito isolados de *Salmonella* spp. de sete surtos toxinfecivos alimentares ocorridos no Rio Grande do Sul além de *Salmonella* Enteritidis ATCC (13076). Foram testados também diferentes formas de extração e suas concentrações, bem como o tempo de contato das bactérias ao extrato. A quantidade de polifenóis totais foram, relacionadas à forma de extração (etanólica e hidroetanólica) e ao tipo de extrato da planta. Os resultados foram apresentados como variáveis arbitrárias sendo 9 a atividade máxima e 1 a não atividade bacteriana. Entre as *Salmonella* spp. houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) em IINIB 7,99 mais resistente a 8,28 mais sensível e os resultados em IINAB 6,77 mais resistente 7,22 mais sensível. As bactérias foram significativamente mais sensíveis aos extratos de estragão do que o de orégano da mesma forma a concentração de 25 % foi mais efetiva que as outras assim como o tempo de contato dos extratos com a bactéria resultou em maior atividade no tempo de 144h. Quanto ao tipo de extração a forma etanólica recebeu maiores notas que a extração Hidroetanólica e quando relacionada a quantidade de fenóis totais foram mais elevadas na etanólica e a planta com maior quantidade de polifenóis foi o estragão. Com esses dados pode-se dizer que as duas plantas mostraram ação bactericida e bacteriostática frente às salmonelas. Na segunda parte do trabalho contaminou-se carne bovina moída com inóculo padrão final em  $10^4$  UFC/mL de salmonela em contato com extratos de *Artemisia dracuncululus* à concentração de 40 % e 45%, o extrato etanólico de *Origanum vulgare* L. Foi testada a sensibilidade do teste diagnóstico de identificação de salmonelas criando uma modificação à técnica padrão oficial do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) acrescentando desestressores que serviram de comparação (teste ouro). Para extrato de estragão observou-se uma sensibilidade do teste em 8 horas de 73,3% e em 24 horas de 40% em quanto para orégano a sensibilidade do teste em 8 horas foi de 93,3% e em 24 horas de 6,6 %. Dessa forma o objetivo desse estudo foi trazer à discussão a necessidade de avaliar os processos de ativação das salmonelas originadas de alimentos contaminados, possibilitando uma qualificação dos resultados preditivos do teste oficial.

Palavras-chaves: *Artemisia dracuncululus* L., *Origanum vulgare* L., atividade antibacteriana, inibição bacteriana, inativação bacteriana, *Salmonella* spp., Sensibilidade diagnóstica.



## ABSTRACT

The *Salmonella* genus bacteria are currently a major concern because of the high incidence of reported cases, and a serious public health problem, due to the severity of the infectious process. Because of that, the control protocols and laws on health surveillance require a total absence of *Salmonella* in food. To ensure food security, there is a growing demand for natural products able to control food pathogens. The condiment plants have been historically used to flavor food, but many of these natural resources have antimicrobial properties. However, little is known about the action of the spices on those pathogens. This study was divided in two parts: The first, through dilution tests in a multiple tube testing system, we determined the Intensity of Activity and Bacterial Inhibition (IINIB) and Intensity of Activity and Bacterial Inactivation (IINAB) of different extracts of *Artemisia dracunculus* L. ("tarragon") and *Origanum vulgare* L. ("oregano"), compared to eight isolated types of *Salmonella* spp. from seven alimentary toxoinfection outbreaks in Rio Grande do Sul, as well as *Salmonella* Enteritidis ATCC (13076). Different forms of extraction and their concentrations, as well as the contact time of the bacteria to the extracts were tested. The amount of total polyphenols were related to the form of extraction (ethanolic and hydroethanolic) and the type of the plant extract. The results were presented as arbitrary variables, showing 9 to the maximum activity and 1 to non-bacterial activity. Among *Salmonella* spp., there was significant difference ( $p > 0.05$ ) in IINIB, 7.99 the most resistant to 8.28 the most sensitive, and results in IINAB 6.77 the most resistant and 7.22 the most sensitive. The bacteria were remarkably more sensitive to tarragon extracts than oregano extracts. Similarly, the 25% concentration was more effective than the others, as well as the contact time of the extracts with the bacteria resulted in a higher activity within 144 h time. Regarding to the type of extraction, the ethanolic form showed higher scores than the hydroethanolic, and when related to the total amount phenols, these were higher in ethanolic extraction, and the highest amount of polyphenols was found in tarragon. With these data we can say that the two plants showed bactericidal and bacteriostatic action on the *Salmonella*. These data show that the two studied plants showed bactericidal and bacteriostatic action on the *Salmonella*. The second part of the study consisted in contacting contaminated ground meat with final standard inoculum 104 CFU / ml of *Salmonella* with extracts of *Artemisia dracunculus* in 40% and 45% concentration, and ethanol extract of *Origanum vulgare*. The responsiveness of the diagnosing test for identification of *Salmonella* was tested, creating a technical amendment to the official standard of the Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), adding de-stressors used as a comparison (gold standard). The tarragon extract showed responsiveness to the test within 8 hours at 73.3% and 24 hours at 40%, while for oregano the test responsiveness was within 8 hours at 93.3% and 24 hours at 6.6%. Therefore, the aim of this study was to discuss the need of evaluating the activation processes of the *Salmonella* originated from contaminated food, enabling a predictive qualification of the official test results.

**Key words:** *Artemisia dracunculus* L., *Origanum vulgare* L., antibacterial activity, bacterial inhibition, bacterial inactivation, *Salmonella* spp., diagnostic sensitiveness.

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Número de sorovares em cada espécie e subespécies do Gênero <i>Salmonella</i> .....	24
Quadro 2	Surto de DTA segundo agente etiológico no período de 1987 – 2002 no Rio Grande do Sul. ....	26

## LISTA DE QUADROS ARTIGO 1

Quadro1	Representação das variáveis IINIB (Intensidade da Atividade de Inibição Bacteriana) e IINAB (Intensidade da Atividade de Inativação Bacteriana) e suas correspondentes diluições e doses infectantes dos inóculos. ....	46
---------	---	----

## LISTA DE TABELAS DO ARTIGO 1

Tabela 1:	Surtos toxinfetivos alimentares no Rio Grande do Sul, Brasil entre 2011 e 2012 que tiveram salmonelas isoladas de alimentos de origem animal.....	44
Tabela 2:	Análise da sensibilidade de amostras de <i>Salmonella enterica</i> expressas em IINIB e IINAB, independentemente da espécie de planta, forma de extração, tempo de contato e concentração do extrato.....	48
Tabela 3:	Valores de IINIB e IINAB de extratos de <i>Artemisia dracunculus</i> e <i>Origanum vulgare</i> , independentemente dos fatores <i>Salmonella</i> spp, tipo de extração, tempo de contato e concentração de extrato.....	49
Tabela 4:	Análise da concentração dos extratos independentemente do tipo da planta, tempo de contato, forma de extração de <i>Salmonella</i> spp. ....	51
Tabela 5:	Valores de IINIB e IINAB segundo o tempo de contato da bactéria frente o extrato, independentes de fatores de tipo da planta, concentração de extrato e forma de extração e <i>Salmonella</i> spp. ....	51
Tabela 6:	Análise da solução extratora representados seu valores em IINIB e IINAB, independente dos fatores <i>Salmonella</i> spp., de tipo da planta, tempo de exposição, concentração do extrato <i>Salmonella</i> spp. ....	52
Tabela 7:	Teor de polifenóis totais de extratos etanólicos e hidroetanólicos de <i>Artemisia dracunculus</i> e <i>Origanum vulgare</i> .....	53

## LISTA DE TABELAS DO ARTIGO 2

Tabela 1:	Surtos toxinfetivos alimentares no Rio Grande do Sul, Brasil entre 2011 e 2012, que tiveram salmonelas isoladas de alimentos de origem animal.....	64
Tabela 2:	Nível de Sensibilidade da técnica dos testes de pesquisa de <i>Salmonella</i> spp. Segundo Instrução Normativa nº62, de 26 de agosto de 2003 com e sem modificação pelo acréscimo de desestressores, com cinco amostras de <i>Salmonella enterica</i> , em modelo carne, simulando alimento com extratos de plantas, incubado a 25°C, com tempo de 08 e 24 horas sobre densidade populacional bacteriana de 10 <sup>4</sup> UFC/ml.....	70

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APT - Água Peptonada Tamponada

BHI: Brain Heart Infusion

BPLS – Brilliant-green pPhenol-red Lactose Sucrose

CDC - Center For Disease Control And Prevention

CEVES - Centro Estadual de Vigilância em Saúde

DTA - Doenças Transmitidas por Alimentos

ECDC - European Centre for Disease Prevention and Control

EFSA - European Food Safety Authority

GL – Gay Lussac

ICTA - Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos

MAPA - Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento

OMS – Organização Mundial da Saúde

RS - Rio Grande do Sul

RV - Rapaport Vassiliadis

SES - Secretaria Estadual da Saúde

TT - Tetrionato

UFC - Unidade Formadora de Colônia

UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

XLT4 - Xylose-Lysine-Tergitol 4

RS – Rio Grande do Sul

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

ATCC – American Tipe Culture Colection

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
2	<b>TEMA DE PESQUISA</b> .....	17
2.1	<b>Problema de pesquisa</b> .....	17
2.2	<b>Hipóteses de pesquisa</b> .....	18
3	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	19
3.1	<b>Doenças Transmitidas por alimentos – DTA</b> .....	19
3.1.1	Panorama das DTAs .....	19
3.2	<b>Importância da Salmonelose em saúde pública</b> .....	22
3.3	<b>Gênero <i>Salmonella</i></b> .....	23
3.4	<b>Validade diagnóstica nos testes de identificação de salmonela em alimentos de origem animal.....</b>	25
3.5	<b>Estresse Bacteriano.....</b>	27
3.6	<b>Plantas medicinais.....</b>	28
3.7	<b>Plantas utilizadas na condimentação alimentar.....</b>	30
3.8	<b><i>Artemisia dracunculus</i> L. ....</b>	32
3.9	<b><i>Origanum vulgare</i> L. ....</b>	34
3.10	<b>Compostos fenólicos .....</b>	37
4	<b>ARTIGO I</b> .....	38
5	<b>ARTIGO II</b> .....	59
6	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	77
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	78
	<b>APÊNDICE A –Resultados dos testes de tubos múltiplos .....</b>	92
	<b>APÊNDICE B - Protocolos de rotina para o controle de procedimentos da técnica de tubos múltiplos.....</b>	95
	<b>APÊNDICE C - Protocolos de rotina para o controle de procedimentos da técnica de identificação de <i>Salmonella spp.</i> conforme MAPA Instrução Normativa Nº 62, DE 26 de agosto de 2003.....</b>	98
	<b>APÊNDICE D - Equação da curva de calibração do ácido Gálico.....</b>	100

<b>APÊNDICE E</b> - Esquema do teste de Identificação de <i>Salmonella</i> spp. segundo a Instrução Normativa N°62, de 26 de agosto de 2003, MAPA, com modificações na técnica. ....	101
<b>ANEXO A</b> - Análises estatísticas.....	102
<b>ANEXO B</b> – Declaração do Herbário em relação a <i>Artemisia dracunculus</i> L.....	109
<b>ANEXO C</b> – Declaração do Herbário em relação a <i>Origanum vulgare</i> L. ....	110
<b>ANEXO D</b> - Resultados de análises laboratoriais de carne moída de 5 amostras realizadas pelo Centro de Ensino, Pesquisa e Tecnologia de Carnes da faculdade de Veterinária da UFRGS. ....	111

## INTRODUÇÃO

Com o aumento da população mundial e melhora de renda em várias regiões do mundo, enfrentamos uma demanda para a produção de alimentos como nunca na história da humanidade. No entanto os riscos à saúde pública também devem ser considerados, avaliando e reavaliando as estratégias de vigilância que são empregadas com intuito de perceber o seu impacto na segurança do alimento e aconselhar as decisões políticas sobre o uso de recursos econômicos (WHO 2013).

Nesse cenário destacamos a *Salmonella* spp. como uma das bactérias de maior importância nos processos de alimentação e saúde. Em diversos países aparece como o microrganismo que mais está envolvido em surtos alimentares (CDC, 2011, EUROPEAN UNION, 2014). No Brasil se reproduz a mesma situação, sendo o agente etiológico mais isolado em surtos toxinfetivos alimentares entre 2000 e 2013, representando 39,39 % dos casos (BRASIL, 2013).

Contudo, o que pode ser analisado através dos registros de surtos no Brasil é de que existe um percentual relevante de notificações em que não chegam a ser identificados os agentes causais, e, segundo dados do Ministério da Saúde esse valor corresponde de 55,73% das ocorrências de DTAs. (BRASIL, 2013).

Segundo WU (2008) os microrganismos sofrem ação de diversos fatores para que seja mantida a inocuidade dos alimentos, como exemplo: a temperatura; a pressão; e adição de aditivos sintéticos ou naturais. Dessa forma, esses procedimentos danificam a constituição microbiana, podendo levar a morte celular ou apenas danificar partes de sua estrutura, criando assim a bacteriostasia. A existência de microrganismos estressados em alimentos e sua recuperação durante procedimentos de cultivo pode representar uma ameaça potencial na segurança alimentar, gerando falsos negativos nas análises microbiológicas de alimentos, suscitando uma discussão do desenvolvimento de métodos de recuperação para a detecção de microrganismos de origem alimentar (BOZOGLU, ALPAS, KALETUNC, 2004; WU; FUNG, 2006).

Vem aumentando o interesse de utilização de plantas como conservantes naturais, servindo de substitutos para os aditivos químicos sintéticos. Técnicas de preservação com tais ingredientes estão sob investigação para a sua aplicação em



produtos alimentícios, com intuito de manter as propriedades organolépticas e estender a vida de prateleira (SUNILSON, 2009, IRKIN, ABAY; AYDIN, 2011; CORDEIRO, PILETTI, 2013).

*Artemisia dracunculus* L. (estragão) tem na culinária francesa um lugar de destaque, e a sua utilização no Oriente médio são comuns (STOBART, 2009). Seu estudo no campo científico tem gerado interesse em diversas áreas como na farmacologia por apresentar substâncias sedativas (CHALESHTORI *et al.* 2013), uso na diabetes (LOGENDRA *et al.* 2006) e na coagulação do sangue (SHAHRIYARY, YAZDANPARAST, 2007). No entanto a atividade antibacteriana tem tido destaque pela característica de seu uso em alimento (CARVALHO, WIEST, GRECO, 2006; RAEISI *et al.* 2012; CHALESHTORI *et al.* 2013)

*Origanum vulgare* L. (orégano) é uma planta condimentar amplamente conhecida e leva o nome de orégano termo que é usado para designar diversas plantas que tem familiaridade de compostos aromáticos principalmente o carvacrol e o timol, (SIMÕES *et al.*, 2003; KINTZIOS, 2004). As pesquisas tem mostrado o efeito dessa planta frente a fungos, leveduras e bactérias, e a ação antimicrobiana frente a patógenos alimentares tem recebido um crescente interesse por vários pesquisadores (ALIGIANNIS *et al.*, 2001; DADALIOGLU *et al.*, 2004; SOUZA *et al.*, 2007; BARROS *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2010, Silveira, 2012).

Os compostos fenólicos são responsáveis pelo sabor, odor e coloração de muitas plantas, também tem sido relacionados com atividade antimicrobiana. Na sua maioria são os metabólitos secundários das plantas produzidos para protegê-las de fatores agressores como a radiação ultravioleta ou patógenos (MANACH, C., 2004; STALIKAS, 2007; CARVALHO, GOSMANN, SCHENKEL, 2007).

Nesse contexto, o presente estudo avaliou *in vitro* a atividade antibacteriana seletiva (Inibição/inativação) de extratos etanólicos e hidroetanólicos, de estragão e orégano confrontando-os com isolados de *Salmonella enterica* de alimentos incriminados em surtos toxinfetivos alimentares no RS. Para tal, levou-se em consideração o tempo de contato dos extratos com as bactérias e as suas concentração, fazendo uma relação quantitativa com polifenóis totais presentes nas duas formas de extração. Também, buscou-se pesquisar a interferência dos extratos etanólicos de estragão e orégano sobre as salmonelas criando condições de bacteriostasia que

afetassem os resultados diagnósticos do teste estabelecido oficialmente para identificação de *Salmonella* spp. de modo a testar a validade preditiva do mesmo, com ênfase à sensibilidade ou seja, à capacidade do teste em detectar resultados positivos verdadeiros, como o menor número de resultados falsos-negativos.

## 2 TEMA DE PESQUISA

Atividade anti-salmonela de extratos de *Artemisia dracunculus* L. e *Origanum vulgare* L. e interferência destas na Sensibilidade do teste de identificação de *Salmonella* spp normatizado pela Instrução Normativa nº 62 do MAPA/Brasil.

### 2.1 Problema de pesquisa

- a) *Artemisia dracunculus* e *Origanum vulgare* usadas em condimentação de produtos alimentícios de origem animal poderiam apresentar atividade anti-salmonela de forma que essa fosse expressa através de Intensidade de Inativação Bacteriana (IINAB) e Intensidade de Inibição Bacteriana (IINIB)?
- b) O Tempo de exposição/confrontação e diferentes concentrações dos extratos das plantas podem interferir na intensidade da atividade antibacteriana das plantas?
- c) A forma de obtenção de extrato bruto destas plantas condimentares ou aromáticas (planta fresca e planta desidratada) pode induzir resultados diferentes quando confrontados com salmonelas isoladas de surtos alimentares e com padrão ATCC?
- d) A utilização dos extratos que apresentarem atividade anti-salmonela *in vitro*, em simulação de alimento em modelo cárneo, poderiam interferir na preditividade diagnóstica positiva e negativa dos testes oficiais recomendados pela Instrução Normativa Nº 62, de 26 de agosto de 2003 (BRASIL, 2003) para identificação de salmonela?

## 2.2 Hipóteses de pesquisa

- a) Os extratos brutos da *Artemisia dracunculus* e *Origanum vulgare* irão apresentar atividade anti-salmonela que, por sua vez, poderá ser diferenciado em IINIB e IINAB, sendo isto possível através de uso de substâncias desestressoras bacterianas acrescidas ao meio de cultura.
- b) A forma de obtenção do extrato bruto irá interferir na ação da planta frente à salmonela, devido a suas características físico-químicas e à concentração do extrato da planta em cada método de extração.
- c) Quanto maior o tempo de exposição, mais efetivo será o controle de crescimento bacteriano e quanto maior a concentração do extrato maior será a sua atividade de controle sobre salmonelas.
- d) Concentrações dos extratos de *Artemisia dracunculus* e *Origanum vulgare* poderão ocasionar apenas bacteriostasia nas salmonelas presentes em alimentos o que interfere, sobretudo, no resultado negativo dos testes oficiais de diagnóstico, causando repercussão na vigilância sanitária e epidemiológica de alimentos e nas condutas frente aos surtos alimentares, uma vez que essa possível interferência não vem sendo considerada.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Doenças Transmitidas por Alimentos - DTA

Quando ocorre a ingestão de alimentos com algum tipo de contaminante - como toxinas, bactérias, vírus, parasitas e substâncias tóxicas e, por consequência, provoca um desequilíbrio no estado de saúde, podemos afirmar que se trata de uma doença transmitida por alimentos ou DTA (BRASIL, 2010).

Um Surto de DTA ou toxinfetivo alimentar é caracterizado quando duas ou mais pessoas apresentam a mesma doença após ingerirem alimentos e/ou água da mesma origem. Entretanto, quando o microrganismo envolvido é classificado de alta severidade, como o *Clostridium botulinum*, a *Escherichia coli* 0157:h7 e a *Listeria monocytogenes*, com apenas um indivíduo diagnosticado pode-se considerar surto (CDC, 2000; GREIG & RAVEL, 2009; BRASIL, 2010).

Os mecanismos patogênicos que estão compreendidos nas causas de DTA podem ser categorizados da seguinte maneira: infecção decorrente da ingestão de microorganismos patogênicos de caráter invasivo de tecidos (*Salmonella* spp. *Yersinia enterocolítica*); toxinfecções causadas por microorganismos toxigênicos que liberam as toxinas ao se multiplicarem, esporularem ou sofrerem lise na luz intestinal; intoxicação originada pela ingestão de toxinas pré-formadas nos alimentos pela proliferação de microorganismos patogênicos como, por exemplo, o *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* (SILVA, 2013; BRASIL, 2010).

##### 3.1.1 Panorama das DTA

Na perspectiva da Organização Mundial da Saúde (OMS), as DTA são uma preocupação na questão de saúde pública para todo o mundo e depende de um sistema de vigilância capacitado a fim de avaliar o impacto das medidas relacionadas à segurança alimentar e aconselhar as decisões políticas sobre o uso econômico de

recursos (WHO, 2013). Desse modo, faz com que os países se responsabilizem, cada vez mais, com a ampliação dos seus sistemas de vigilância, para garantir a segurança do alimento, uma vez que os processos de produção, industrialização, circulação e consumo de alimentos assumiram escalas gigantescas, exigindo-se maior cuidado no acompanhamento dessa estratégia (SILVA; AMARAL, 2004; MACHADO, 2005).

Segundo o Centers for Disease Control and Prevention (CDC), no seu relatório de estimativas de doenças transmitidas por alimentos dos surtos ocorridos no ano de 2011, foram listados os cinco agentes patogênicos que contribuem com 88% das hospitalizações referentes as DTA nos EUA: *Salmonella* spp. (não tifoide) - 35%; Norovírus - 26%; *Campylobacter* spp. - 15%; *Toxoplasma gondii* - 8% e *E. coli* (STEC) 0157 - 4% (CDC, 2011).

A União Europeia, através do European Food Safety Authority (EFSA) e European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), lançou os dados de surtos alimentares referentes ao ano de 2012, mostrando os agentes causais mais relevantes: *Salmonella* spp. - 1533 casos (aumento de 2,13% em relação a 2011); toxinas bacterianas - 777 casos, viroses - 756 casos e *Campylobacter* spp. (EUROPEAN UNION, 2014).

No Brasil, dados do Ministério da Saúde do período de 2000 a 2013 apresentam 7.361 surtos de DTA. Dos agentes etiológicos envolvidos nos surtos, os mais relevantes foram: *Salmonella* spp. (39,39%), *Staphylococcus aureus* (19,71%), *Echerichia coli* (12,40%), *Bacillus cereus* (7,62%) e em 55,73% dos casos não se obteve a identificação do agente etiológico (BRASIL, 2013).

O perfil epidemiológico das doenças transmitidas por alimentos no Brasil ainda é pouco conhecido e carente de dados, apenas alguns estados e/ou municípios dispõem de estatísticas e referências sobre os agentes causadores de DTA mais comuns, alimentos mais frequentemente envolvidos e fatores contribuintes (AMSON, HARACEMIV; MASSON, 2006). Entretanto, o país tem intensificado as ações de prevenção, vigilância e controle de doenças transmitidas por alimentos (DTA), por meio de estratégias de cooperação internacional e nacional, interinstitucional e intersetorial, o que possibilita uma melhoria na coleta de dados e de suas práticas. (OPAS, 2010).

A relação de registros de surtos por regiões brasileiras, no período do ano de 2000 e 2013, demonstraram uma diferença significativa tomando a seguinte distribuição por região: Sudeste com 39,8%, Sul com 38,9%, Nordeste com 11,9%, Centro Oeste com 5,9% e a Norte com 3,5% dos casos (BRASIL 2013). Estes resultados, em parte, podem ser explicados pelos sistemas de vigilância mais estruturados com capilarização nos interiores para dar conta do registro de grande número de ocorrências de casos de DTA (OPAS, 2010). Bartz (2008), fazendo um levantamento de dados nos sistema de vigilância epidemiológica do Estado do Rio Grande do Sul, destacou uma estrutura funcional e coordenada em todas as regiões do estado, tendo um histórico de coleta de informações de surtos alimentares há mais de 20 anos.

No mundo, existe uma alta percentagem de subnotificação nos casos de DTA e as cifras evidenciam a magnitude desse problema nos países demonstrando a fragilidade dos programas de prevenção e controle (OPAS, 2010). Estima-se que a incidência de casos de DTA pode ser apenas 01% da verdadeira incidência, visto que a maioria dos surtos ocorre em residências e, na maior parte deles, o curso da doença apresenta sinais clínicos brandos com uma melhora rápida da condição do indivíduo, o que corrobora para uma estimativa muito baixa da realidade das DTA. (KÄFERSTEIN, MOTARJEMI & BETTCHER, 1997; COSTALUNGA, TONDO, 2002; KOTTWITZ *et al.*, 2010).

Até mesmo em países onde o sistema de registro é mais bem estruturado como nos Estados Unidos, o problema da subnotificação é relevante, podendo estar em torno de 20% dos casos que são informados ao CDC (RANTHUM, 2002). Wheeler e colaboradores (1999) estimaram que na Inglaterra, a cada ano, ocorrem 94 milhões de casos de DTA, sendo que apenas um entre 136 casos é notificado ao serviço de saúde pública do país.

BRONER *et al.* (2010) relata que há acréscimo nos números de DTA registrados em vários países e que isso pode estar associado ao envelhecimento da população, pois os indivíduos, nesse caso, ficam mais susceptíveis a doenças alimentares, além disso, fatores socioambientais, mudanças de hábitos de consumo e aumento no número de refeições coletivas contribuem para essa situação.

### 3.2 Importância da salmonelose na saúde pública

No Brasil, entre 1999 e 2008, foram notificados 6.062 surtos de DTA, envolvendo 117.330 pessoas doentes e 64 óbitos. Dentre os agentes etiológicos identificados, a *Salmonella* spp. destacou-se com a maior prevalência, alcançando 42,9% dos isolamentos (BRASIL, 2008). Quando atualizados com os dados do Ministério de Saúde para 2000 e 2013 que apresentam 7.361 surtos de DTA a *Salmonella* continua sendo o principal agente causal com 39,39% (BRASIL, 2013).

No Rio Grande do Sul, entre 1999 e 2008, foram notificados 3.200 surtos alimentares, expondo 286.314 pessoas, sendo que 41,4% dos surtos investigados ocorreram em serviços de alimentação, destacando-se, novamente, *Salmonella* spp. dentre os agentes encontrados, com a prevalência de 44,76% (CUNHA, 2008). Numa pesquisa realizada no sul do país, levando em consideração os dados dos sistemas de vigilância dos estados (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul), a *Salmonella* spp. aparece como a bactéria mais relevante encontrada em pacientes e preparações alimentícias no período de 1999 a 2008 (KOTTWITZ *et al.*, 2010). Pinto (1999), no período de 1988 a 1997 no Rio Grande do Sul, observou que a prevalência de salmonela nos isolamentos de alimentos, cresceu, significativamente, de 33,63 % para os já referidos 44.76%, em questão de uma década.

Nos Estados Unidos, mais de 40.000 casos de salmonelose são notificados anualmente e desses mais de 95% dos casos ocorridos foram por consumo de alimentos contaminados impróprios ou que no momento de seu preparo passaram por processos de manuseio inadequado (CDC, 2000).

Lequiem (2010), na França, compilou os dados hospitalares referentes aos surtos toxinfetivos que acometeram 12.549 pessoas, sendo o agente etiológico identificado como *Staphylococcus* em 32% dos casos e *Salmonella* spp. em 25%, e constatou que 71% dos surtos de salmonelas ocorreram durante o verão.

A importância do gênero *Salmonella* em saúde coletiva permanece em evidência, considerando sua resistência no meio externo, mais especificamente em resíduos, dejetos, alimentos para consumo humano e animal, solo e águas de abastecimento, manifestando-se tanto individualmente como em centenas de indivíduos



por meio de surtos. Sua verdadeira incidência é difícil de ser avaliada, considerando as deficiências da vigilância epidemiológica e de sua relação com a notificação, o que não impede o aumento significativo do número de focos constatados (ACHA; SZYFRES, 2001).

Nesse sentido, em saúde e produção animal, com conseqüente repercussão na cadeia alimentar, Castagna, Schwarz e Canal (2004) demonstram a presença de *Salmonella* spp. no trato intestinal e em tonsilas/linfonodos submandibulares de suínos, em 79% das amostras utilizadas no preparo de embutidos, constituindo importante fator de risco para a contaminação de carcaças utilizadas na fabricação de alimentos de origem animal.

Em um estudo que avaliou a qualidade de carne de porco picada produzida em diversos matadouros do Rio Grande do Sul, valendo-se da técnica de número mais provável (NMP), constatou que 93,3% das amostras tiveram presença de *Salmonella* ssp. e atingiram valores entre 03 a 240 Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/g (BOROWSKY *et al.*, 2007).

Apesar de o número de subnotificações ser elevado, é a partir da década de 70 do século XX, que tem ocorrido um considerável aumento do número de registros de salmonelose que tem variado quanto aos tipos de sorovares envolvidos nos surtos (CARDOSO; TESSARI, 2008). Dentre os sorovares de *Salmonella enterica* o que tem sido mais reportado é o Enteritidis (MÜRMAN *et al.*, 2008; KOTTWITZ *et al.*, 2010) e o número de casos de salmonelose causada pela *Salmonella* Enteritidis tem aumentado ao redor do mundo (HUMPHREY; JORGENSEN, 2006). Pesquisa realizada no Rio Grande do Sul selecionou 75 amostras isoladas de alimentos incriminados em surtos de salmonelose no período de 1999 a 2000 e evidenciou que 73 (97%) pertenciam ao sorovar Enteritidis e dessas, 62 (82,7%) apresentaram um gene plasmidial *spvR*, que está relacionado a virulência da bactéria (GEIMBA *et al.*, 2004).

### **3.3 Gênero *Salmonella***

O gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae e é caracterizado por bactérias em forma de bastonete (bacilos) Gram-negativos, não esporulados, dotados de flagelos tipo peritríqueos, os quais são responsáveis pela mobilidade, exceto *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* que não formam esporos e são anaeróbios facultativos (GRIMONT; GRIMONT; BOUVET, 2000).

O valor de pH ótimo para a multiplicação da *Salmonella* varia entre 4,5 e 9,0, abaixo de 4,1 podem ser inativadas. Possuem pouca resistência à luz solar e à maioria dos desinfetantes fenóis, clorados e iodados (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). O intervalo da temperatura de crescimento para a *Salmonella* spp. fica entre 05° e 47°C sendo que o seu nível ótimo é a 37°C. Como não formam endoesporos, são relativamente termossensíveis, ou seja, não sobrevivem acima de 55°C por mais de 20 minutos (KIM; BHUNIA, 2008; QUINN *et al.*, 2011). Fazem uso da fermentação da glicose, produzindo ácido e gás, porém são incapazes de metabolizar a lactose e a sacarose (FORSYTHE, 2013).

Apesar de ter um grande debate entre especialistas sobre o assunto da classificação e taxonomia do Gênero *Salmonella*, o que é usado e amplamente aceito é, atualmente, o de que existem apenas duas espécies (TINDAL *et al.*, 2005) que podem ser observados no Quadro 01.

Quadro 01: Número de sorovares em cada espécie e subespécies do Gênero <i>Salmonella</i>		
Espécie	Subespécie	Número de sorovares
<i>Salmonella. Entérica</i>	<i>enterica</i>	1.547
	<i>salamane</i>	513
	<i>arizone</i>	100
	<i>diarizone</i>	341
	<i>houtenae</i>	73
	<i>indica</i>	13
<i>Salmonella. Bongori</i>		23
Total		2.610

Fonte: adaptado de Guibourdenche *et al.*, 2010.

Os sorovares da *S. enterica* são designados geralmente pelo lugar geográfico de onde o sorotipo foi identificado pela primeira vez é o nome escrito em letras romanas e não itálicas, sendo a primeira maiúscula. As formas antigênicas dos sorovares estão listadas em um documento chamado de esquema White-Kauffmann-Le Minor que fica

sob responsabilidade da OMS no Centro de referência de pesquisa de *Salmonella*, em Paris na França (GUIBOURDENCHE *et al.*, 2010).

### **3.4. Validade diagnóstica nos testes de identificação de salmonela em alimentos de origem animal.**

Segundo Côrtes (1993), qualquer que seja a natureza do diagnóstico, inclusive o bacteriológico em alimentos, seu embasamento vai apoiar-se sempre em critérios capazes de garantir a *confiabilidade* ou a *preditividade* do resultado obtido e permitir a tomada de decisões e de condutas, sejam elas relativas à terapêutica individual ou à determinação e instituição de medidas sanitárias relacionadas às populações expostas e mesmo ao meio ambiente envolvido.

A validade de um teste refere-se a quanto, em termos mensuráveis, o mesmo pode diagnosticar um evento (validade simultânea ou concorrente) ou para predizê-lo (Validade Preditiva). Para comparação, utilizam-se resultados de um teste padrão ou também denominado “padrão ouro” (OPAS, 1997). Uma doença pode estar presente ou ausente e o teste pode ser negativo ou positivo e, com isso, as respostas possíveis para o resultado de um teste podem ser expressas de quatro formas possíveis: verdadeiro positivo; verdadeiro negativo; falso positivo e falso negativo (BONITA; BEAGLEHOLE; KJELLSTRÖM, 2011).

Considerando que a *sensibilidade* (a proporção de infectados que o método é capaz de detectar ou qualificar corretamente como positivos) e a *especificidade* (proporção de não infectados que o método é capaz de qualificar corretamente como negativos) são os parâmetros fundamentais no estabelecimento da validade preditiva de um procedimento diagnóstico, isto é, na avaliação da capacidade do método em foco de realmente medir ou expressar aquilo que efetivamente se propõe. O ideal então estaria representado por aquele método que, através de resultado positivo, revelasse, efetivamente, a presença do atributo ou infecção considerado e que, por outro lado, um resultado negativo fosse indicador seguro da ausência do atributo em questão. Em outras palavras, a VPR + (*Validade preditiva dos resultados positivos*) indicaria a proporção de resultados verdadeiros no conjunto de resultados positivos, nestes

incluídos os falso-positivos, enquanto a VPR - (*Validade preditiva dos resultados negativos*) indicaria a proporção de resultados verdadeiros no conjunto de resultados negativos, aí incluídos os falso-negativos. Globalizando a análise, o autor sugere, dessa forma, o *Coefficiente Global* (eficácia) do método diagnóstico (CG) que indicaria, finalmente, a proporção de resultados tanto positivos como negativos, que o método classifica corretamente (CÔRTEZ, 1993).

Pode-se constatar, a partir da análise epidemiológica dos surtos de doenças transmitidas por alimentos (BRASIL, 2008), no âmbito nacional, que de 1999 a 2008, em 51,0% dos surtos toxinfetivos alimentares, o agente etiológico não foi identificado. Quando consideramos os dados mais atuais da mesma fonte, no período de 2000 a 2013, o número para os surtos sem resultado comprobatório do agente etiológico sobe para 55,73% dos casos (BRASIL, 2013).

No Rio Grande do Sul (RS), os registros referentes aos surtos toxinfetivos vêm sendo realizados desde 1980 e é um dos estados onde os dados estão sendo compilados há mais tempo (CUNHA, 2008). No quadro 02, é possível observar como se distribuem os números de casos por agente etiológico.

Quadro 02: Surtos de DTA Segundo Agente etiológico no período de 1987 – 2002 no Rio Grande do Sul.		
Agente etiológico	Número registrado de surtos	%
<i>Salmonella</i> spp.	655	38,73
Não identificados	596	35,25
<i>Staphylococcus aureus</i>	196	11,59
Coliformes de origem fecal	102	6,03
<i>Escherichia coli</i>	38	2,25
<i>Bacillus Cereus</i>	34	2,01
<i>Clostridium</i> sp.	30	1,77
<i>Shigella</i> sp.	28	1,66
Substancias tóxicas	12	0,71
Metais pesados	0	0
TOTAL	1691	100

Fonte: Divisão de Vigilância Epidemiológica/Centro Estadual de Vigilância em Saúde/Secretaria Estadual de Saúde/RS, 2012.

As diretrizes estabelecidas pela World Health Organization (1967), retomadas por Pinto e Bergmann (2002) e Lequien (2010), enfatizam a necessidade da investigação epidemiológica em casos de surtos alimentares notificados, atendendo a

história clínica (sinais, sintomas, alimentos envolvidos e suas taxas de ataque, atividade das pessoas envolvidas, período de incubação etc.) e outras informações pertinentes, obtidas por entrevistas de todos os envolvidos ou expostos no surto, independente de se apresentarem doentes ou não, abrangendo um recordatório alimentar das últimas 72 horas anteriores ao aparecimento dos sinais ou sintomas. Os autores recomendam ainda a coleta de amostras para isolamento do agente causal, constituídas de fezes, urina, conteúdo gástrico/vômito ou lavagem, bem como dos alimentos envolvidos segundo sua taxa de ataque, devendo ainda ser registradas as condições de armazenamento na hora da apreensão ou coleta das amostras alimentares.

Os trabalhos que visam analisar os surtos quanto ao seu local de ocorrência continuam afirmando que a maioria dos surtos notificados ocorreu em residências, no comércio de alimentos ou em serviços de alimentação (CUNHA, 2008; MERUSSI; MAFFEI; CATANOZI, 2012; ALMEIDA *et al.*, 2013). No processo de investigação epidemiológica prescrita nestas situações, nenhuma informação é solicitada, principalmente nas condições domiciliares e de serviços coletivos, quanto à condimentação, aromatização, às técnicas de pré-preparo e de preparação, aspectos culturais de gastronomia étnica ou mesmo religiosa, entre outros possíveis, pois falta formação por parte dos investigadores sobre os fatores intervenientes na preditividade diagnóstica bacteriológica, mormente naquela dos resultados negativos/ falso-negativos, quando da investigação laboratorial dos possíveis agentes causais transmissíveis envolvidos nos alimentos apreendidos, após a investigação epidemiológica concomitante (PINTO; BERGMANN, 2002; FIGUEIREDO, 2013).

### **3.5. Estresse bacteriano**

O conceito de bactéria estressada ou injuriada é utilizado para aquelas células que sobrevivem a uma situação de estresse que causa dano a algumas de suas qualidades distintivas (AGRANOVSKI, *et al.*). Esse estado pode ser gerado pela ocorrência de processos de aquecimento, secagem, irradiação, produtos químicos como desinfetantes entre outros fatores (WU *et al.*, 2001).

Algumas alterações podem acontecer quando os microorganismos são submetidos a lesões subletais, mudando os componentes estruturais e funcionais dos organismos afetados, como parede celular, citoplasma membrana ou membrana interior, ribossomas, DNA, RNA e diversas enzimas (RAY, 1993), no entanto, a membrana celular parece ser o elemento mais comumente afetadas (JAY, 2005).

A importância da identificação de microorganismos com danos subletais é de relevância na pesquisa de bactérias em alimentos, pois podem passar despercebidos por testes convencionais de identificação e contagem, porém possuem a capacidade de se restabelecer e tornar-se funcionalmente normais em um ambiente favorável causando problemas de saúde e problemas na produção de alimentos (JAY, 2005). Segundo Wu (2008), ratifica a importância de incorporar novos métodos de recuperação de células com lesões subletais (estressadas), pois esses procedimentos podem garantir uma melhor resposta verdadeira aos testes de análise microbiológica.

A recuperação de bactérias estressadas pode dar-se através de meios sólidos ou líquidos, que com diferentes composições bioquímicas, fornecem as condições para a célula lesionada recuperar o seu processo de multiplicação. (WU, 2008).

Alguns elementos têm sido utilizados para auxiliar na recuperação das condições favoráveis de replicação celular, sendo acrescidos aos meios de cultura. Esses elementos reagem com compostos que afetam o mecanismo de reparação da célula auxiliando no processo de recuperação da porção da célula danificada e neutralizando a ação de desinfetantes, pode-se citar como exemplos o Polissorbato de Tween 80, Lecitina, Histidina e Tiosulfato de Sódio (DVG, 1981; ANDRADE & MACEDO, 1996; REYBROUCK, 1998; BRITISH STANDARDS INSTITUTION, 2006).

### **3.6. Plantas medicinais**

Na história da humanidade, mesmo antes do domínio do cultivo já se fazia uso de plantas como recursos de alimentação, de cura e ritualísticos. Vestígios encontrados em arcada dentária de Neandertal (que se estima ter vivido há 50 mil anos) demonstraram a presença de compostos que são majoritários em *Achillea millefolium*

(milefólio) e *Matricaria chamomilla* (camomila) o que sugere um conhecimento sofisticado de uso de plantas (HARDY *et al.*, 2012).

Um dos registros escritos mais antigos foi encontrado na China, cerca de 3.000 a.C., a obra “Nei Ching”, do imperador Huang-ti, que é de importância fundamental para o esclarecimento sobre o estágio de conhecimento em que se encontravam os chineses no campo da medicina e da farmacologia (DAWSON, 1991). Assim como os chineses, outras civilizações no curso da história contribuíram tais como assírios e babilônicos que deixaram em seu legado a relação de pelo menos 250 plantas com virtudes curativas, entre elas se destacam a hortelã, a papoula, a romã, o gengibre e outros (CUNHA, 2003). Os árabes na obra “Corpo dos Simples de Ibnal-baitam fazem um estudo da farmacopeia com suas fórmulas de manipulação. Dos gregos, o que mais se destacou foi Hipócrates que apresenta na sua obra “*Corpus Hipocraticum*” uma descrição sobre a arte de curar, com grandes quantidades de plantas medicinais, tendo sido baseado em conhecimentos empíricos e de outras civilizações como a micênica e cretense (IFTODA, 2001).

A Organização Mundial da Saúde estima que 80% da população mundial depende da medicina tradicional para suas necessidades básicas de saúde e que desse percentual quase 85% envolve o uso de plantas medicinais, seus extratos vegetais e seus princípios ativos (AKERELE, 1993).

A utilização e comercialização de plantas medicinais têm sido estimuladas pela crescente demanda da indústria por novas fontes naturais de medicamentos e, por outro lado, devido aos efeitos colaterais causados pelos fármacos sintéticos que estimulam o aproveitamento de medicamentos de origem vegetal ou, em muitos casos, porque representam a única fonte de medicamentos, especialmente nos lugares mais isolados e distantes, e como resposta aos problemas imediatos de saúde (VEIGA JÚNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Como as plantas têm uma função polivalente quanto ao seu uso (medicinal, ornamental, condimentar aromática, tóxica, inseticida, repelente e de cunho místico religioso) tem se utilizado, recentemente, o termo “plantas bioativas” para designar seu papel quanto às substâncias ou compostos que possam interferir ou alterar o funcionamento de outros seres vivos (SCHIEDECK, 2006).

### 3.7. Plantas utilizadas na condimentação alimentar

Uma característica amplamente explorada de algumas plantas é a capacidade de conferir sensorialidade aos alimentos e as que possuem essa qualidade são denominadas de plantas condimentares ou especiarias. Segundo a Agência de vigilância Sanitária (ANVISA), na Resolução Diretoria Colegiada (RDC) nº 276, de 22 de setembro de 2004, que aprova o regulamento técnico para especiarias, temperos e molho define que: “Especiarias são os produtos constituídos de partes (raízes, rizomas, bulbos, cascas, folhas, flores, frutos, sementes, talos) de uma ou mais espécies vegetais, tradicionalmente utilizadas para agregar sabor ou aroma aos alimentos e bebidas” (BRASIL, 2004).

Na legislação alimentar brasileira, a questão das plantas condimentares apresenta-se um tanto defasada no tempo, percebe-se isso ao realizar o estado da arte da pesquisa neste segmento. Segundo Brasil (1952), o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal, todavia vigente (RIISPOA), diversas vezes alterado por decretos até 1997, em seu Capítulo VI, estabelece que as conservas de alimentos de origem animal podem ser adicionadas de condimentos, com a finalidade de temperá-las. Permite-se a utilização de condimentos tais como o alho (*Allium sativum* L.), manjerona (*Origanum majorana* L.), pimentas (*Capsicum* sp L.), pimentões (*Capsicum annuum* L.) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.). O mesmo documento permite, ainda, o emprego de outros produtos que realcem o sabor das conservas, desde que aprovados pelo órgão competente e mediante sua declaração nos rótulos.

Na epidemiologia e profilaxia de doenças transmissíveis, a pesquisa de fatores de proteção, sustentáveis, alternativos, dirigida a recursos naturais renováveis, como plantas com indicativo medicinal, condimentar ou aromático, constitui prioridade segundo a Organização Mundial da Saúde/Conferências Mundiais de Saúde (AKERELE, 1988, 1993; CULTURA, 1984, 1985, 1990), com ênfase aos aspectos culturais tradicionais envolvidos e sua relação com a atenção básica em saúde coletiva, em alimentos/alimentação e em saúde e produção animal (OPAS, 1990).

Mais especificamente em alimentos e alimentação, pesquisas relacionadas à atividade antimicrobiana de compostos naturais sobre a multiplicação bacteriana, podem levar a sua utilização em novas tecnologias, melhorando a qualidade e a segurança



alimentar (MAU *et al.*, 2001). Neste sentido, a contaminação microbiana constitui uma das maiores preocupações em todos os segmentos alimentares, desde a sua produção, no momento de agregação de valor/industrialização e mesmo durante seu consumo, buscando-se reduzir o emprego de preservantes químicos sintéticos, que poderão, muitas vezes, ser substituídos por alternativas naturais, menos prejudiciais à saúde e, por vezes, mais viáveis economicamente (VIUDA-MARTOS *et al.*, 2008; MURTHY; NAIDU, 2012). Numerosas manifestações, conforme relatado por Livermore (2007) demonstram e justificam a necessidade de diminuir o uso de antimicrobianos em geral, conduzindo o uso dos mesmos da forma mais correta possível e adotando-se, cada vez mais, medidas profiláticas alternativas eficazes.

A condimentação vegetal de alimentos é uma prática milenar na culinária de países do mundo inteiro, realçando aromas e sabores em diversas preparações alimentares. Nas últimas décadas, verifica-se um aumento expressivo no uso de plantas condimentares em decorrência de alguns fatores como, por exemplo, a valorização do uso de produtos mais naturais e também o fato de que as pesquisas, nas áreas farmacológica e médica, confirmam a eficácia de muitas dessas plantas (FURLAN, 2007). Ressalta-se ainda que a qualidade de uma planta condimentar esteja na maioria das vezes relacionada com a presença de um grupo de substâncias denominadas genericamente como óleo essencial, que são compostos voláteis, naturais e complexos, caracterizados por um forte odor e são formados por plantas aromáticas com metabólitos secundários (BAKKALI *et al.*, 2008). Observam-se, porém, exceções como acontecem com as pimentas do gênero *Capsicum*, que têm como principal substância ativa a capsaicina, que é classificada como alcaloide (SANTOS *et al.*, 2012), enquanto o urucum (*Bixa orellana* L.) apresenta carotenoides como a bixina e a nor-bixina (HETZEL; PÉREZ & SÁNCHEZ, 2010) , sendo, igualmente, a vinagreira (*Hibiscus sabdariffa*) rica em diferentes flavonoides (MACIEL *et al.*, 2012) , todos de significativo interesse como recursos condimentares, mas também medicinais e mesmo antimicrobianos.

Existe a pressão, por parte dos consumidores, relacionada ao uso de agentes antimicrobianos naturais devido a questionamentos sobre a segurança ligada aos aditivos químicos sintéticos. Técnicas de preservação alternativas com tais ingredientes de origem natural estão sob investigação para a sua aplicação em produtos alimentícios

para que mantenham as propriedades organolépticas preservadas e extensa vida de prateleira (CORDEIRO; PILETTI, 2013).

Essa nova perspectiva tem acionado estudos de atividade biológica desses recursos naturais através de testes de extratos de plantas, incluindo os óleos essenciais (EOs) e essências de extratos vegetais. Neste contexto, as plantas com OEs estão ganhando importância para o seu potencial como conservante, uma vez que têm a classificação de "geralmente reconhecido como seguros" (GRAS- Generally Recognized As Safe) e uma ampla aceitação por parte dos consumidores (BURT, 2004 e GUTIERREZ; BARRY-RYAN; BOURKE, 2004).

### **3.8. *Artemisia dracunculus* L.**

A *Artemisia dracunculus* recebe diversos nomes em diferentes países: na França é chamada de estragon; na Inglaterra, de tarragon; na Itália, de dragoncello, estragone e no Brasil, de estragão (STOBART, 2009). A palavra *dracunculus* é de origem latina que significa pequeno dragão, esse nome foi estabelecido pelo botânico Carl von Linné, inspirado pelas raízes da planta que apresentavam um aspecto de uma pequena cobra sinuosa, por esse motivo que na Suécia, país de origem do taxonomista, o nome mais conhecido é de planta dragão (BAILEY, 1977).

Nativa da Sibéria e Ásia ocidental foi introduzida na Europa pelos árabes, quando da ocupação da Espanha. O estragão ganhou destaque por causa da culinária francesa, por ser utilizado em pratos feitos com peixes, aves e ovos. A variedade mais procurada a *Artemisia dracunculus* var. *sativa* confere melhor sensorialidade, porém por sua dificuldade de plantio devido à viabilidade de suas sementes é a que tem menor disponibilidade dessa forma. A maior disponibilidade se encontra na variedade *inodora*, conhecida como estragão-russo que é considerado de menor qualidade aromática para usos culinários (NORMAN, 2012).

É uma planta herbácea de 0,5 a 0,7m de altura, as folhas são alternas e glabras. As florescências são ramificadas com flores pediceladas que amadurecem de baixo para cima. As flores externas são férteis, sem estame e as flores centrais são estéreis e produzem um fruto tipo aquênio. Deve ser podada no inverno e coberta com forragem para protegê-la de geada, os canteiros precisam ser renovados a cada três anos, pois há

uma tendência de diminuição das propriedades aromáticas (COUTO, 2006; USA, 2013).

O óleo essencial de estragão é responsável pelas suas características aromáticas e corresponde de 0,3 a 1% do peso da planta (SAYYAH *et al.*, 2004). O óleo essencial é formado principalmente por monoterpenos cujo composto majoritário é o estragol (metilcavicol) de ocorrência muito comum em condimentos vegetais como manjerição, erva doce e outras espécies (FORNARI *et al.*, 2012). Entretanto, essa substância está presente no óleo essencial em uma concentração bem significativa estimada entre 68 a 80 %, outros compostos como o cis e trans ocimeno ( $\alpha$ -ocimeno e  $\beta$ -ocimeno) entre 06 e 12% e limoneno de 2 a 6%. A quantidade dos compostos químicos está diretamente ligada à subespécie, habitat reprodutivo e período do ano que a planta é colhida (SAYYAH *et al.*, 2004; KORDALI *et al.*, 2005).

O estragão tem sido estudado junto com outras plantas como um alternativo para extração de benzodiazepínicos naturais como substitutos para os medicamentos sintéticos. Kavadias *et al.* (2000) pesquisou o extrato de *Artemisia dracunculus* e identificou dois compostos que são delorazepam e temazepam e que tem afinidade de ligação ao receptor de GABAA, que é local de ligação de várias drogas tranquilizantes, anticonvulsivantes, ansiolíticas e sedativas; no entanto, os dois representaram apenas uma quinta parte de afinidade para os receptores, o que permite constatar que existem outras substâncias com essa compatibilidade, mas que não foram identificadas no experimento (LOGENDRA *et al.*, 2006).

Outros investigadores têm se preocupado com a relação de compostos bioativos da *A. dracunculus*, influenciando diretamente os processos de diabetes e mostrando resultados bastante promissores. Swanston-Flatt (1989) demonstraram que o estragão tem um efeito redutor sobre o peso corporal de camundongos que foram induzidos a diabetes. Logendra *et al.* (2006) testando extratos etanólicos de estragão tiveram a diminuição da concentração de glicose no sangue e sugerem a utilização do extrato de *A. dracunculus* para melhoramento de complicações diabéticas.

Estudos do uso tradicional de estragão, no Irã, para problemas ligados ao sangue, demonstraram que extratos etanólicos de folhas de *Artemisia dracunculus* inibiram de forma eficaz a adesão de plaquetas e agregação e secreção de proteínas induzidas pela

trombina, podendo estar relacionada na diminuição dos transtornos trombolíticos (SHAHRIYARY; YAZDANPARAST, 2007).

Raeisi *et al.* (2012) com interesse de procurar substitutos de aditivos naturais como fator de proteção em alimentos, pesquisou o óleo de *A. dracunculus* que demonstrou atividade antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, ambos encontrados no queijo branco iraniano. Outro estudo procurou relacionar a composição química do óleo essencial de estragão com oito bactérias patogênicas comumente achadas em alimentos e foram encontrados diferentes graus de inibição sob o efeito do óleo no crescimento das estirpes bacterianas sendo *S. aureus* a mais resistente e *Klebsiella oxitoca* a mais sensível. Os autores relacionaram a presença do metilcavicol (84,83%) como responsável pela ação antimicrobiana, no entanto, refletem que a ação efetiva é devida a um somatório de todas as partes menores do óleo essencial (CHALESHTORI *et al.*, 2013).

Apesar das preocupações sobre os efeitos tóxicos de seus principais constituintes, nenhuma toxicidade aguda ou atividade mutagênica foi relatada em doses relevantes para o consumo humano. Extratos de *A. dracunculus* contêm quantidades muito baixas em relação ao todo da planta, de estragol e metil eugenol e, portanto, pode-se considerar um risco muito limitado (RIBNICKY, 2004).

### **3.9. *Origanum vulgare* L.**

*Origanum vulgare* é uma planta condimentar amplamente conhecida e usada em vários tipos de preparação alimentar, comumente denominada por orégano. Tem a sua origem em regiões montanhosas e pedregosas do sul da Europa, onde cresce abundantemente em uma ampla faixa de altitude 0 a 400m (NORMAN, 2012).

*Origanum vulgare* é uma planta herbácea da família *Lamiaceae*, pertence ao gênero *Origanum* que possui diversas espécies de características aromáticas. O caule forma touceiras, tem folhas simples e pequenas com flores esbranquiçadas, róseas ou violáceas, dispostas em glomérulos e reunidos em inflorescências paniculadas terminais (LORENZI, 2002; COUTO, 2006).

A classificação taxonômica do gênero *Origanum* passou por muitas mudanças desde que foi caracterizado pela primeira vez por Linneus em 1754. Dentro deste gênero se reconhecem três grupos, 10 seções, 38 espécies, seis subespécies e 17 híbridos que foram categorizados por características morfológicas. Como exemplo cita-se o comprimento de hastes, disposição, número e comprimento de folhas e comprimento de pecíolos. No entanto, a classificação tem sido revista a partir de ferramentas genéticas e outros arranjos de organização dentro do gênero têm sido sugeridos (KINTZIOS, 2004).

O termo orégano é uma designação dada para um aroma e um sabor característico primário de algumas plantas que tem semelhanças nos seus compostos fitoquímicos, nos seus óleos essenciais, principalmente, o carvacrol e o timol. O termo pode ser usado para mais de 60 espécies no mundo todo, sendo as famílias *Lamiaceae* e *Verbenaceae* as de maior distribuição (KINTZIOS, 2004). Dos oréganos, o mais comum na culinária mundial é o grego (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* [Link] Ietswaart), o orégano espanhol (*Coridothymus capitatus* [L.] Hoffmanns e Link), o orégano turco (*Origanum onites* L.) e o orégano mexicano (*Lippia graveolens* HBK), porém o mais consumido no mundo são os do gênero *Origanum* (KOKKINI *et al.*, 1995; MARTINO *et al.*, 2009).

Os óleos essenciais do orégano são compostos de substâncias lipofílicas, voláteis, que dão aroma característico a essa espécie e que também estão envolvidos nos mecanismos de defesa dessas plantas. São compostos, principalmente, por monoterpenos e sesquiterpenos, e seus derivados oxigenados, tais como álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos, fenóis, éteres e ésteres (ANITESCU, DONEANU, RADULESCU, 1997).

A composição química do óleo essencial de *Origanum vulgare*, em número de compostos ativos, gira em torno de 34, sendo os fenóis de maior predominância como o Carvacol, timol, gamaterpenos e p-cineno. Essa configuração tem uma relação direta ao tipo de ação da planta, uma vez que esses compostos já foram testados para controle de fungos, leveduras, bactérias (SOUZA *et al.*, 2007; SILVEIRA, 2012).

A quantidade e qualidade do óleo essencial assim como outros componentes fitoquímicos do orégano, podem ser influenciados por diversos fatores desde a questão genética (WANG, LINCOLN, 2004) até a estação do ano, (JOHNSON *et al.*, 2004)

condições climáticas, de solo, relevo (KOKKINI *et al.*, 1995) e de adubação (CORRÊA *et al.*, 2010).

*Origanum vulgare* tem sido motivo de diversos estudos pelo seu potencial antimicrobiano, principalmente o óleo essencial que possui uma variedade de substâncias fitoquímicas que tem demonstrado controle frente a microorganismos de interesse na alimentação (ALIGIANNIS *et al.*, 2001; DADALIOĞYLU *et al.*, 2004; SOUZA *et al.*, 2007; BARROS *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2010, SILVEIRA, 2012).

Oliveira, Soares e Piccoli (2013) avaliaram o efeito antimicrobiano do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. e frente a *Salmonella enterica* sorotipo Enteritidis, inoculadas em carne bovina moída, durante 6 dias de armazenamento refrigerado, percebeu-se que as análises dos tempos e concentrações de óleo demonstraram uma redução das populações microbianas ao longo do tempo de estocagem e até mesmo inativação da bactéria pelo óleo, ficando a concentração inibitória mínima em 3.90µL/ml. Os resultados levam a entender que a ação conjunta de óleo e armazenamento refrigerado pode ser uma alternativa para a conservação desse produto.

### **3.10. Compostos fenólicos**

Os compostos fenólicos são um grupo de elementos que representam uma grande variedade de produtos, que podem ser de estruturas simples e complexas, que possuem uma hidroxila ligada diretamente a um anel aromático. Esses compostos estão classificados em diversas classes conforme o tipo de esqueleto principal: ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinâmico, antocianinas, proantocianidinas, flavonoides, flavanonas, isoflavonas, estilbenos e lignanas entre outras (MANACH *et al.*, 2005; (CARVALHO, GOSMANN, SCHENKEL, 2007).

A maioria dos compostos fenólicos não é encontrada no estado livre e sim na forma de ésteres ou heterosídicos, possibilitando serem obtidos a partir de um extrato etanólico da planta fresca ou seca. Quanto à sua estabilidade podem ser facilmente oxidados, principalmente em meios básicos e, é por esse motivo, que se recomenda evitar valores de pH extremos (MORAES-de-SOUA, 2007; FERNANDEZ *et al.*, 2008).

Nas plantas, os compostos fenólicos são os metabólitos secundários produzidos para protegê-las de fatores agressores como a radiação ultravioleta ou patógenos. No entanto, esses compostos têm sido relacionados com outras atividades que incluem absorção de nutrientes, síntese proteica, atividade enzimática, fotossíntese e alelopatia (MANACH, C., 2004; STALIKAS, 2007).

Os pesquisadores que estudam os polifenóis têm mostrado bastante interesse na ação antioxidante destes, principalmente para os profissionais da área de nutrição preventiva, pois estas substâncias estão associadas à proteção contra doenças cardiovasculares, envelhecimento, modulação do metabolismo carcinógeno, aumento da resposta imune e inibição da proliferação celular (FILHO; SILVA; BOVERIS; 2001).

São os compostos fenólicos responsáveis pelo sabor, odor e coloração de muitas plantas. A uva é um exemplo importante da ação dessas substâncias que estão associadas às características próprias da fruta e determinam sensorialidade aos seus produtos até mesmo como fator de proteção com ação antioxidante (CARVALHO, GOSMANN, SCHENKEL, 2007).

Morais *et al.*(2009) realizou um estudo com os chás e condimentos de grande consumo no Brasil e entre tantas espécies foram estudadas 13 plantas. Todas tiveram bom potencial antioxidante quando comparadas com o eugenol, cuja atividade já é comprovada na literatura como capaz de inibir os radicais livres presentes no organismo.

## 4 ARTIGO 1

Atividade antibacteriana de extratos de *Artemisia dracunculus* L. e *Origanum vulgare* L frente a isolados de *Salmonella* spp de surtos toxinfetivos alimentares.

Giovani Girolometto<sup>1</sup>, Aline Campos Vieira<sup>2</sup>, José Maria Wiest<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS.

<sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS.

### Resumo

Através de testes de diluição em sistemas de tubos múltiplos determinou-se a Intensidade de Atividade de Inibição Bacteriana (IINIB) e a Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana (IINAB) de diferentes extratos de *Artemisia dracunculus* L. (“estragão”, “taragon”) e *Origanum vulgare* L. (“orégano”) frente a oito isolados de *Salmonella* spp. de sete surtos toxinfetivos alimentares ocorridos no Rio Grande do Sul, além de *Salmonella* Enteritidis ATCC (13076). Foram testadas também diferentes formas de extração e suas concentrações, bem como o tempo de contato das bactérias com o extrato. Essas variáveis foram, por sua vez, relacionadas à quantidade de polifenóis totais de cada forma de extração e extrato de planta. Os resultados foram apresentados como variáveis arbitrárias sendo 9 a atividade máxima e 1 a não atividade bacteriana. Entre as *Salmonella* spp. houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) em IINIB 7,99 mais resistente a 8,28 mais sensível e os resultado em IINAB 6,77 mais resistente 7,22 mais sensível. As bactérias foram significativamente mais sensíveis aos extratos de estragão do que aos de orégano, da mesma forma a concentração de 25 % foi mais efetiva do que as outras, assim como o tempo de contato dos extratos com a bactéria resultou em maior atividade no tempo de 144h. Quanto ao tipo de extração, a forma etanólica recebeu maiores notas que a extração hidroetanólica e quando relacionada a quantidade de fenóis totais foi mais elevada na etanólica e a espécie com maior quantidade de polifenóis foi o estragão. Com esses dados pode se dizer que as duas espécies mostraram ação bactericida e bacteriostática frente as salmonelas.

Palavras chaves: *Artemisia dracunculus*, *Origanum vulgare*, inibição bacteriana, inativação bacteriana e *Salmonella*.



## ABSTRACT

Through dilution tests in a multiple tube testing system, we tested the Intensity of Activity and Bacterial Inhibition (IINIB) and Intensity of Activity and Bacterial Inactivation (IINAB) of different extracts of *Artemisia dracunculus* L. ("tarragon") and *Origanum vulgare* L. ("oregano"), compared to eight isolated types of *Salmonella* spp. from seven alimentary toxoinfection outbreaks in Rio Grande do Sul, as well as *Salmonella Enteritidis* ATCC (13076). Different extraction forms and concentrations, as well as the time of contact of the bacteria with the extract, were also tested. Those variables were related to the amount of total polyphenols of each extraction method and plant extract. The results were presented as arbitrary variables, showing 9 to the maximum activity and 1 to non-bacterial activity. Among *Salmonella* spp., there was significant difference ( $p > 0.05$ ) in IINIB, 7.99 the most resistant to 8.28 the most sensitive, and results in IINAB 6.77 the most resistant, and 7.22 the most sensitive. The bacteria were remarkably more sensitive to tarragon extracts than to oregano extracts. Similarly, the 25% concentration was more effective than the others, as well as the contact time of the extracts with the bacteria resulted in a higher activity within 144 h time. Regarding to the type of extraction, the ethanolic form showed higher scores than the hydroethanolic, and when related to the total amount phenols, these were higher in ethanolic extraction, and the highest amount of polyphenols was found in tarragon. Those data we can say that the two species showed bactericidal and bacteriostatic action on *Salmonella*.

**Key words:** *Artemisia dracunculus*, *Origanum vulgare*, bacterial inhibition, bacterial inactivation and *Salmonella*.

## 1. INTRODUÇÃO

A contaminação dos alimentos por microrganismos patogênicos é uma preocupação mundial que envolve questões de saúde pública e que causa perdas econômicas na produção e comercialização de alimentos. Dentre os agentes causadores de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), o que mais tem se destacado é a *Salmonella* spp., que em diversos países aparece como a bactéria que mais está envolvida em surtos alimentares (CDC, 2011, EUROPEAN UNION, 2014) e no Brasil está presente em 39,39% dos surtos investigados e registrados entre 2000 e 2013 (BRASIL, 2013). No Rio grande do Sul, essa situação é muito parecida, apresentando a

*Salmonella* spp com a maior porcentagem de casos de surtos toxinfetivos alimentares registrados, ou seja, 44,76% (CUNHA, 2008).

As bactérias do Gênero *Salmonella*, na questão taxonômica, estão organizadas em duas espécies, seis subespécies e pouco mais de 2600 sorovares classificadas através de suas formas antigênicas e estão listadas em um documento chamado de esquema White-Kauffmann-Le Minor que fica sob responsabilidade da OMS no Centro de referência de pesquisa de *Salmonella*, em Paris, na França (GUIBOURDENCHE *et al.*, 2010).

A Organização Mundial da Saúde (OMS), por intermédio das Conferências Mundiais de Saúde, tem construído um referencial sobre recursos naturais renováveis, como plantas com indicativo medicinal, condimentar ou aromático, orientando que essas alternativas sejam prioridade na abordagem em epidemiologia e profilaxia de doenças transmissíveis e pesquisa de fatores de proteção, sustentáveis (AKERELE, 1988, 1993), com ênfase aos aspectos culturais tradicionais envolvidos e sua relação com a atenção básica em saúde coletiva, em alimentos/alimentação e em saúde e produção animal (Organizacion Panamericana de la Salud- OPAS, 1990).

Segundo a Anvisa, essas plantas condimentares são denominadas como especiarias, pois são espécies vegetais que tradicionalmente são usadas para conferir sabor e aroma a alimentos e bebidas (Brasil, 2004). Vem aumentando o interesse da utilização dessas plantas como conservantes naturais por possuírem capacidade de prolongar a vida de prateleira dos alimentos sem o perigo dos aditivos químicos sintéticos (CORDEIRO, PILETTI, 2013).

O estragão é nativo da Sibéria e Ásia ocidental, foi introduzida na Europa pelos árabes, quando da ocupação da Espanha e teve maior destaque na culinária francesa, dando o tom em pratos feitos com peixes, aves e ovos (STOBART, 2009). A *Artemisia dracunculus* var. *sativa* é a mais procurada para condimentação, pois sua sensorialidade é mais agradável, no entanto, a variedade inodora “estragão-russo” é mais disponível no mercado e, por essa razão, é a mais usada (NORMAN, 2012).

No campo da pesquisa científica, o estragão tem sido estudado em diversas possibilidades como no tratamento da diabetes (LOGENDRA *et al.*, 2006) por seus compostos naturais que substituem os benzodiazepínicos sintéticos (CHALESHTORI *et al.*, 2013), em transtornos trombolíticos (SHAHRIYARY, YAZDANPARAST, 2007). Entretanto, o interesse como atividade antibacteriana, principalmente com patógenos

alimentares, tem tido bastante relevância (RAEISI *et al.*, 2012; CHALESHTORI *et al.*, 2013).

*Origanum vulgare* L. “orégano” é uma planta condimentar amplamente conhecida e usada em muitos tipos de preparação alimentar é originária das regiões montanhosas e pedregosas do sul da Europa, onde crescem abundantemente em uma ampla faixa de altitude 0-400m (NORMAN, 2012). O termo orégano é comum em mais de 60 espécies e é usado para caracterizar plantas que se assemelham em aroma e sabor característico, assim como em alguns compostos fitoquímicos, principalmente o carvacrol e o timol (SIMÕES *et al.*, 2007).

O interesse sobre o óleo essencial dessa planta é muito grande, uma vez que utilizada para alimentação, na perfumaria, bem como, na utilização em indústria de alimentos visa controlar microrganismos causadores de deterioração e/ou causadores de doenças veiculadas por alimentos (SOUZA *et al.*, 2007).

O óleo essencial de *Origanum vulgare* tem em média 34 compostos químicos sendo os de maior predominância o Carvacol, timol, gama-terpenos e p-cineno que já foram testados para controle de microorganismos. A atividade biológica contra patógenos alimentares tem recebido um crescente interesse por vários pesquisadores (ALIGIANNIS *et al.*, 2001; DADALIOGLU *et al.*, 2004; SOUZA *et al.*, 2007; BARROS *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2010, SILVEIRA *et al.*, 2012).

Compostos fenólicos são os metabólitos secundários das plantas produzidos para protegê-las de fatores agressores como a radiação ultravioleta ou patógenos (STALIKAS, 2007). São os compostos fenólicos responsáveis pelo sabor, odor e coloração de muitas plantas, também muitos são relacionados com atividade antimicrobiana (CARVALHO, GOSMANN, SCHENKEL, 2007).

Nesse contexto, o presente estudo avaliou, “*in vitro*”, a atividade antibacteriana seletiva (Inibição/inativação) de extratos etanólicos e hidroetanólicos, de *Artemisia dracunculus* L. e *Origanum vulgare* L., confrontando-os com isolados de *Salmonella enterica* de alimentos que foram incriminados em surtos toxinfetivos alimentares no RS. Ainda assim, levando em consideração o tempo de contato dos extratos com as bactérias e as suas concentrações, faz-se uma relação quantitativa de polifenóis totais nas duas formas de extração.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Espécies vegetais utilizadas

*Artemisia dracunculus* L. – *ASTERACEAE* (“estragão” “tarragon”) foi colhida em propriedade de produção orgânica localizada no bairro Lami em Porto Alegre (coordenadas 30°13’ S e 51°04’ O). Já o *Origanum vulgare* L. - *LAMIACEAE* (orégano) foi colhido em propriedade particular de produção urbana agroecológica, no bairro Boa Vista, em Porto Alegre (coordenadas 30°01’ S e 51°10’).

As plantas foram caracterizadas e identificadas botanicamente, a partir de exsiccatas segundo Ming (1996), e encaminhadas para identificação botânica e registro no Herbário do Departamento de Botânica, do Instituto de Biologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, recebendo numeração: ICN 17616 (Estragão/Lami) e ICM 165042 (Orégano/Boa Vista).

### 2.2. Produção dos extratos vegetais

Utilizou-se toda a parte aérea das plantas (ramos, folhas e flores) que foram colhidas no período de primavera e verão de 2012 e 2013. Para elaboração dos extratos foi utilizado como solução extratora o álcool etílico produzido através da fermentação de cereais (FARMAQUIMICA<sup>®</sup>, Porto Alegre, Brasil). O primeiro extrato foi feito com planta fresca, ou seja, recém colhida, triturada e colocada em maceração com o álcool etílico a 96°GL, na proporção de 400g da planta com 1000mL do solvente. O segundo extrato foi preparado com planta seca, em ambiente ventilado, protegido de incidência solar, posteriormente triturada e misturada ao álcool etílico a 70°GL, na proporção de 100g de planta para 1000mL de álcool (FARMACOPÉIA, 1959). Estes extratos foram guardados em vidros com tampa metálica em rosca, vedados e abrigados da luz, sendo agitados periodicamente.

Para a retirada da porção alcoólica dos extratos alcoólico e hidroalcoólico, as soluções, previamente coadas, foram submetidas ao evaporador rotativo, à temperatura de 60°C, em rotação entre 50 e 40rpm, sob pressão negativa de 600mm/Hg (BRASIL, 2010). O resultado desta extração foi considerado como a concentração 100%.

Fez-se o controle da esterilidade dos extratos, a cada processo de extração, retirando-se uma alíquota de 05mL e colocando-a em tubos com caldo BHI (Brain Hearth Infusion, Himedia<sup>®</sup>, Monbai, India) que foram incubados a 37°C, por 24 e 48 horas. O resultado foi confirmado por inoculação em placas de Petry com ágar nutriente, verificando-se a presença ou não de microrganismos.

## 2.2. *Salmonella spp.*

No período de outubro, novembro e dezembro de 2011 e janeiro, fevereiro e março de 2012, foram selecionados sete surtos, de forma intencional, com diferentes sorovares de *Salmonella*. Todos os alimentos incriminados nos surtos tinham procedência animal. Os isolados foram cedidos pelo Laboratório Central do Estado (LACEM). A Tabela 01 demonstra os dados em relação aos surtos selecionados.

Ao grupo de bactérias isoladas de surtos (Tabela 01), acrescentou-se uma *Salmonella* Enteritidis padrão internacional (ATCC 13076), formando assim o acervo de inóculos que foram utilizados no experimento. As bactérias foram mantidas em cultura BHI ágar (Merck<sup>®</sup>, Darmstadt, Germany), sob refrigeração com repliques quinzenais, na Bacterioteca, no Laboratório de Higiene do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA), da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Tabela 01. Surtos toxoinfecciosos alimentares no Rio Grande do Sul, Brasil, entre 2011 e 2012 e que tiveram salmonelas isoladas de alimentos de origem animal.

Surto	Data de registro do surto	Alimento incriminado	Município	<i>Salmonella</i> amostras	Pessoas envolvidas	Pessoas hospitalizadas
1	08/10/2011	Sanduiche	Triunfo	<i>S. Infantis</i>	74	0
2	10/10/2011	Pastel assado	Santa Maria	<i>S. Enteritidis</i>	13	0
3	04/01/2012	Salada de Batata	Santa Cruz do Sul	<i>S. Enteritidis</i>	30	11
4	23/01/2012	Carne assada	Cachoeira do Sul	<i>S. Enteritidis</i>	07	0
5	25/01/2012	Linguiça suína defumada	Gramado Xavier	<i>S. Derby</i>	12	01
6	25/01/2012	Burguer frango e queijo e vegetais	Porto Alegre	<i>S. Enteritidis</i>	1030	12
6	25/01/2012	Burguer carne e vegetais	Porto Alegre	<i>S. Enteritidis</i>	1030	12
7	19/03/2012	Salame caseiro/carne e suína	Uruguaiana	<i>S. Braenderup</i>	16	0

Fonte: Divisão de Vigilância Epidemiológica (DVE), Programa de Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas pelos Alimentos do Centro Estadual de Vigilância em Saúde (CEVS), da Secretaria Estadual de Saúde do Estado do Rio Grande do Sul (SES-RS).

### 2.3. Reativação e Linha de Diluição de Inóculo

A reativação das bactérias aconteceu com a retirada de uma alíquota das colônias em estoque na bacterioteca, que foi repassada para tubos de ensaio, contendo 05mL de caldo BHI e incubada a 37°C por 18 a 24 horas. Após, foi retirado 01mL dessa cultura bacteriana e colocado em tubo de ensaio contendo 09mL de água destilada estéril formando a primeira diluição ( $10^{-1}$  UFC/mL) e assim, sucessivamente, até se atingir o oitavo tubo, referente a  $10^{-8}$ UFC/mL. Dessa forma logarítmica, constituiu-se concentrações bacterianas controladas, formando sucessivas diluições com diferença,

entre elas, de um fator logarítmico (AVANCINI *et al.*, 2002; AVANCINI; WIEST, 2008).

Para aferição da contagem populacional bacteriana, foi realizada a semeadura de 100µL das duas últimas diluições ( $10^{-7}$  e  $10^{-8}$ UFC /mL), em placas de Petry com ágar BHI (Himedia<sup>®</sup>, Monbai, Índia<sup>®</sup>), espalhando de maneira uniforme com alça de Drigalski, deixando-as por 24 horas em estufa a 37°C para contagem de colônias. Só foram utilizados os inóculos que apresentaram na diluição  $10^{-7}$ , no mínimo, entre 10 e 100UFC/mL, e na diluição  $10^{-8}$  >1 ou <10 UFC/mL, segundo técnica biométrica de Cavalli-Sforza (1974).

#### 2.4. Teste de atividade antibacteriana

A técnica utilizada para a determinação da atividade antibacteriana dos extratos etanólico e hidroetanólico de *Artemisia dracunculus* e de *Origanum vulgare* foi a do Sistema de Tubos Múltiplos, utilizada pela Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (Sociedade Alemã de Medicina Veterinária (DVG, 1981)), modificada por Avancini (2002).

Dois linhas contendo oito tubos cada uma foram dispostos para cada bactéria. Na primeira linha, os tubos continham 4,5mL de meio de cultura BHI duplamente concentrado e 4,5mL do extrato vegetal. A segunda série de tubos continha os mesmos itens, acrescidos de três desinibidores/desestressores na proporção de 3% de polissorbato de TWEEN 80 (Sinth<sup>®</sup>, Diadema, Brasil), 0,3% de Lecitina de soja (Delaware<sup>®</sup>, Porto Alegre, Brasil) e 1% de histidina (Synth<sup>®</sup>, Diadema, Brasil).

As duas séries de tubos receberam 01mL de inóculo retiradas das diluições seriais logarítmicas ( $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ UFC mL<sup>-1</sup>). Posteriormente verificou-se o crescimento bacteriano através da presença ou ausência de microrganismos viáveis nas placas de Petry com ágar nutriente. Transferiram-se alíquotas dos tubos às placas através de alça bacteriológica de platina e a leitura realizou-se após 24, 48, 72 e 144 horas de incubação a 37°C (DVG, 1981; AVANCINI; 2002).

Os resultados foram lidos como Intensidade de Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia (IINIB) e Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana/bacteriocida (IINAB). Entende-se por IINIB/bacteriostasia, o resultado do confronto da bactéria com a solução antibacteriana em meio específico e por IINAB/

bacteriocida o mesmo resultado, porém sob a influência dos dessestressores bacterianos acrescidos ao BHI (DVG, 1981; ANDRADE & MACEDO, 1996; REYBROUCK, 1998). Esses valores são representações da atividade biológica inibitória/bacteriostasia ou inativadora/bacteriocida de diferentes soluções antibacterianas sobre os microrganismos (AVANCINI & WIEST, 2008).

Os resultados de intensidade de atividade de IINIB e IINAB foram representados por variáveis ordinais arbitrárias que assumiram valores de 01 a 09. Esses valores indicam a intensidade antimicrobiana que uma solução testada tem sobre uma população de microrganismos, como demonstra o Quadro 01 a seguir.

Quadro 01. Representação das variáveis IINIB (Intensidade da Atividade de Inibição Bacteriana) e IINAB (Intensidade da Atividade de Inativação Bacteriana) e suas correspondentes diluições e doses infectantes dos inóculos:

Variáveis ordinais de intensidade de ação	9	8	7	6	5	4	3	2	1
UFC/ml – Doses infectantes inibidas ou inativadas	$10^7$	$10^6$	$10^5$	$10^4$	$10^3$	$10^2$	$10^1$	$10^0$	
UFC/ml – diluições do inóculos inibidas ou inativadas	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$	n.a *

Fonte: adaptado de Avancini *et al.* 2002. \*n.a nenhuma atividade biológica

## 2.5. Polifenóis

Para a extração de polifenóis totais elegeu-se a metodologia de Vinson *et al.* (2001) com modificações. De acordo com essa metodologia, 100µL do extrato foram colocados em tubos tipo eppendorf, sendo acrescidos com 500µL de solução de extração contendo metanol (Grupo Químico<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil) a 50% e ácido clorídrico (Nuclear<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil) a 1,2M. Os tubos foram colocados em banho-maria a 90°C durante três horas. Depois de resfriados em temperatura ambiente, o volume foi completado com 01mL de metanol absoluto (Grupo Químico<sup>®</sup>). Em sequência, centrifugaram-se as amostras (5.000rpm/5minutos) e os sobrenadantes resultantes dessa manipulação denominaram-se extratos de polifenóis totais (FALLER & FIALHO, 2009). Todo o procedimento aconteceu com três repetições em triplicata.



Para expressão dos valores de polifenóis totais utilizou-se o reagente de Folin-Ciocalteu (Merck® Darmstadt, Germany) conforme a metodologia de Karou *et al.* (2005). No primeiro momento preparou-se uma solução com o reagente Folin-Ciocalteu e água deionizada 1:1 (v/v). Na sequência, colocou-se 60µL de extrato de polifenol em tubos de eppendorf, acrescentou-se 150µL de solução Folin-Ciocalteu, deixando-se a mistura reagir por cinco minutos e, em seguida, agregou-se 150µL de Carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) a 20% (Vetch®, Rio de Janeiro, Brasil). Por último, foram adicionados 840µL de água deionizada. A solução ficou 30 minutos em repouso.

Completado o tempo de repouso, fez-se a leitura no espectrofotômetro (Biospectro® São Paulo, Brasil) com a absorvância de 750nm, tendo o ácido Gálico (Nuclear®, São Paulo, Brasil) servido como padrão. O teor de polifenóis totais foi determinado por interpolação da absorvância das amostras contra uma curva de calibração construída com os padrões de ácido gálico (10 a 150 µg/mL) e expresso como mg de EAG (equivalentes de adição de ácido gálico) por 100ml de extrato.

## 2.6. Tratamento estatístico dos resultados

Os dados resultantes dos testes foram compilados em um banco organizado no programa Microsoft Excel e depois tratados com o software Statistix 9.0. Através da Análise da Variância entre os fatores e as significâncias submetidas ao teste de Tukey.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 02, analisa-se o comportamento dos nove sorovares de *Salmonella* estudadas, pode-se perceber uma diferença entre elas quando comparadas estatisticamente através de análise de variância e teste de Tukey ( $p < 0,005$ ). Outros estudos que analisaram o óleo essencial de *Origanum vulgare* L. em relação à atividade antibacteriana, através de métodos diferentes, utilizando diversos sorovares de isolados de *Salmonella enterica*, percebe-se que as respostas diferem significativamente entre elas podendo resultar em inativação ou inibição dos inóculos (SANTURIO *et al.*, 2007, LAVINIKI, 2013).

No entanto, levando-se em consideração uma análise descritiva dos testes e a questão das diluições logarítmicas dos microrganismos, averigua-se que essa diferença não é tão elevada. A *S. Infantis* isolada do surto um (Tabela 01) demonstrou, em IINIB, ser a bactéria mais resistente aos extratos das plantas e quando compara-se esse resultado com o sorovar que demonstrou ser o mais sensível, ou seja, *S. Enteritidis*, do surto seis, constata-se que a diferença entre elas em relação à IINIB não ultrapassa um log. Quando analisa-se as IINABs, percebe-se que a relação entre a mais resistente e a mais sensível passa a ser menos expressiva, deixando o grupo de salmonelas mais heterogêneo.

Tabela 02. Análise da sensibilidade de amostras de *Salmonella enterica* expressas em IINIB e IINAB, independentemente da espécie de planta, forma de extração, tempo de contato e concentração do extrato.

<i>Salmonella enterica</i>	Origem	Valores Arbitrários*	
		IINIB	IINAB
<i>S. Infantis</i>	Surto 1	7,99 <sup>b A</sup>	6,96 <sup>bc B</sup>
<i>S. Enteritidis</i>	Surto 2	8,27 <sup>a A</sup>	7,22 <sup>a B</sup>
<i>S. Enteritidis</i>	Surto 3	8,11 <sup>ab A</sup>	7,03 <sup>ab B</sup>
<i>S. Enteritidis</i>	Surto 4	8,17 <sup>ab A</sup>	6,93 <sup>bc B</sup>
<i>S. Derby</i>	Surto 5	8,17 <sup>ab A</sup>	7,17 <sup>ab B</sup>
<i>S. Enteritidis</i>	Surto 6	8,09 <sup>ab A</sup>	6,98 <sup>abc B</sup>
<i>S. Enteritidis</i>	Surto 6	8,28 <sup>ab A</sup>	7,06 <sup>ab B</sup>
<i>S. Braenderup</i>	Surto 7	8,22 <sup>a A</sup>	7,17 <sup>ab B</sup>
<i>S. Enteritidis</i>	ATCC 13076	8,22 <sup>a A</sup>	6,77 <sup>c B</sup>

\*valores arbitrários representam, através de pontuação, a intensidade de atividade antibacteriana (IINIB e IINAB) em média de 03 repetições independentes, sendo 09 = atividade máxima e 01 = não atividade. Letras maiúsculas diferentes sobrescritas na mesma linha representam diferenças significativas entre IINIB e IINAB para análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas diferentes sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as bactérias para análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Analisando-se os resultados com ausência e presença de desinibidores representados por IINIBs e IINABs, respectivamente, percebe-se que todas as bactérias possuem diferença significativa ( $p < 0,05$ ). As diferenças entre os resultados de IINIB e

IINAB médias ficam em torno de um fator logarítmico, mas se compararmos os resultados médios com o tempo de contato apresentado na Tabela 05, que aparece posteriormente, pode-se notar, nas primeiras 24 horas, a diferença entre a IINIB e IINAB é maior e que tal diferença vai diminuindo com o passar do tempo. Esse resultado indica maior atividade antibacteriana dos extratos com maior tempo de contato com os inóculos avaliados.

O uso de desinibidores/desestressores (Tween 80, lecitina e histidina) tem sido relatado em vários trabalhos que analisaram extratos de plantas com o método de tubos múltiplos e que fazem uso deles para demonstrar a capacidade bacteriostática e bacteriocida dos extratos de plantas. Tal técnica vem ao encontro do que foi utilizado em diversos experimentos (SOUZA, A, 2007; GIROLOMETTO *et al.*, 2009, ARAUJO *et al.*, 2009; CARVALHO; WIEST; CRUZ, 2005; MACIEL *et al.*, 2012).

Quando analisadas as duas espécies de plantas (Tabela 03) em relação à atividade antibacteriana, independentemente das demais variáveis manipuladas, foi observado que o estragão apresenta ação bactericida e bacteriostática maior e difere significativamente em análise de variância e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) em relação ao orégano.

Tabela 03. Valores de IINIB e IINAB de extratos de *Artemisia dracunculus* e *Origanum vulgare*, independentemente dos fatores *Salmonella* spp, tipo de extração, tempo de contato e concentração de extrato vegetal.

Plantas	Valores Arbitrários*	
	IINIB	IINAB
<i>Artemisia dracunculus</i>	8,60 <sup>a A</sup>	7,26 <sup>a B</sup>
<i>Origanum vulgare</i>	7,72 <sup>b A</sup>	6,78 <sup>b B</sup>

\*valores arbitrários representam, através de pontuação, a intensidade de atividade antibacteriana (IINIB e IINAB) em média de 03 repetições independentes, sendo 09 = atividade máxima e 01 = não atividade. Letras maiúsculas diferentes sobrescritas na mesma linha representam diferenças significativas entre IINIB e IINAB para análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas diferentes sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as plantas para análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Bonyadian e Moshtaghi (2008) investigaram o potencial antibacteriano do óleo essencial de estragão em quatro patógenos bacterianos, *Salmonella* Typhimurium, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, e *Bacillus cereus*, apresentando resultados em que as duas primeiras tiveram maior sensibilidade à planta. Nesse contexto, Benli, Kaya e Yigit (2007) testaram a capacidade de extrato de estragão de controlar microorganismos frente a um grupo de nove bactérias e quatro cepas de leveduras, todas de padrão internacional. Foram avaliadas quatro soluções de extração que constataram ação inibitória para quatro bactérias, sendo a *Pseudomonas aeruginosa* a única sensível a todas as soluções dos extratos.

Na presente pesquisa, o extrato de orégano obteve médias de IINAB (7,72) e IINIB (6,78) bastante satisfatória, mesmo tendo recebido valores pouco abaixo do estragão, em relação à ação antibacteriana, é possível dizer que teve ação intensa frente às salmonelas testadas. Constata-se essa resposta em outros estudos que utilizaram técnicas diferentes e oréganos de diversas partes do mundo e obtiveram resultados de controle de bactérias patogênicas relacionadas com alimentos, entre essas, sorovares de *Salmonella enterica*, (GUNDUZ GT, GONUL SA, KARAPINAR M. 2010; OLIVEIRA, SOARES & PICCOLI, 2013).

Quando analisados os diferentes níveis de concentração do extrato das plantas testadas (Tabela 04), independentemente do tipo, tempo de contato, forma de extração e *Salmonella*, observa-se que todas as concentrações diferem entre si com um grau de significância de  $p < 0,05$  no teste de Tukey, tanto nos valores de IINIB quanto IINAB. A sensibilidade geral das bactérias foi maior nos valores em que os extratos vegetais estavam mais concentrados, é possível observar na concentração de 25% os maiores valores de IINIB (8,84) e de IINAB (8,56), ficando muito próximos da intensidade máxima que é 9,0. Vale mencionar ainda que na Tabela 04 não foram colocados os valores de concentração de 10%, pois esses não puderam ser analisados estatisticamente uma vez que a análise de variância foi nula. Sendo assim, todas as salmonelas atingiram a nota 01, que representa a nenhuma atividade do extrato frente aos microrganismos testados.

Tabela 04. Valores de IINIB e IINAB em análise de concentração dos extratos vegetais, independentemente da espécie de planta, tempo de contato, forma de extração e de amostras de *Salmonella enterica*.

Nível de concentração dos extratos vegetais	Valores Arbitrários*	
	IINIB	IINAB
25%	8,84 <sup>a A</sup>	8,56 <sup>a B</sup>
20%	8,0 <sup>b A</sup>	6,9 <sup>b B</sup>
15%	7,64 <sup>c A</sup>	5,56 <sup>c B</sup>

\*valores arbitrários representam, através de pontuação, a intensidade de atividade antibacteriana (IINIB e IINAB) em média de 03 repetições independentes, sendo 09 = atividade máxima e 01 = não atividade. Letras maiúsculas diferentes sobrescritas na mesma linha representam diferenças significativas entre IINIB e IINAB para análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas diferentes sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os níveis de concentração para análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Na tabela 05, onde as análises foram conduzidas com o fim de averiguar o tempo de contato das salmonelas com o meio de cultura e os extratos das plantas, pode-se perceber a ação progressiva do efeito dos extratos vegetais, tanto bacteriostático como bactericida. Esse resultado traz a importância do tempo de contato da bactéria em relação ao antibacteriano.

Tabela 05. Valores de IINIB e IINAB em análise do tempo de contato da bactéria frente ao extrato independente de fatores de tipo de planta, concentração de extrato e forma de extração e *Salmonella* spp.

Tempo de contato	Valores Arbitrários*	
	IINIB	IINAB
24 horas	7,07 <sup>d A</sup>	5,29 <sup>d B</sup>
48 horas	7,97 <sup>c A</sup>	6,56 <sup>c B</sup>
72 horas	8,65 <sup>b A</sup>	7,59 <sup>b B</sup>
144 horas	8,95 <sup>a A</sup>	8,73 <sup>a A</sup>

\*valores arbitrários representam, através de pontuação, a intensidade de atividade antibacteriana (IINIB e IINAB) em média de 03 repetições independentes, sendo 09 = atividade máxima e 01 = não atividade. Letras minúsculas diferentes sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças significativas entre o tempo de contato para análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

A Tabela 06 apresenta resultados relativos aos tipos de extratos empregados. Considerando apenas essa variável, independentemente das outras variáveis, percebeu-se diferença significativa entre as duas extrações realizadas, sendo o extrato etanólico o que teve maiores notas de IINIB e IINAB.

A variável manipulada que alterou durante a confecção dos extratos é a planta que pode estar *in natura* (recém colhida) ou desidratada (seca à sombra). Pinela *et al.* (2011), testando vários tipos de citrus quanto ao tipo de secagem (natural à sombra, congelamento e liofilização), observaram diminuição significativa dos compostos fenólicos e da ação antioxidante das amostras vegetais testadas.

Tabela 06. Análise da solução extratora, representados seus valores em IINIB e IINAB independente dos fatores *Salmonella* spp., de tipo de planta, tempo de exposição, concentração do extrato *Salmonella* spp.

Solução de Extração	Valores Arbitrários*	
	IINIB	IINAB
Etanólico (96°GL)	8,35 <sup>a A</sup>	7,16 <sup>a B</sup>
Hidroetanólico (70° GL)	7,98 <sup>b A</sup>	6,88 <sup>b B</sup>

\*valores arbitrários representam, através de pontuação, a intensidade de atividade antibacteriana (IINIB e IINAB) em média de 03 repetições sendo 09 = atividade máxima e 01 = não atividade. Letras maiúsculas diferentes na mesma linha representam diferenças significativas entre IINIB e IINAB para análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas diferentes na mesma coluna na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as bactérias para análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Os dados da Tabela 06 corroboram com os encontrados em relação aos valores de polifenóis totais dos extratos etanólicos e hidroetanólicos dos extratos em que já havia sido retirada a porção etanólica, restando apenas o extrato a 100% (Tabela 07).

Os valores de polifenóis totais encontrados nos extratos variaram conforme o tipo de extração utilizada e conforme a planta. O estragão teve o teor de polifenóis mais alto quando relacionado ao extrato etanólico (96°GL), confeccionado com a planta fresca. O menor teor de polifenóis foi registrado nos extratos de orégano quando a

forma de extração foi feita com a planta seca (hidroetanólico). Esses resultados podem ser comparados com atividade biológica da ação dos extratos frente às bactérias uma vez que os extratos que obtiveram maior controle sobre as salmonelas também tiveram maior quantidade de polifenóis na sua composição.

Tabela 07. Teor de Polifenóis totais de extratos etanólicos e hidroetanólicos de *Artemisia dracunculus* e *Origanum vulgare*.

Planta	Extrato etanólico		Extrato hidroetanólico	
	Média*	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
<i>Artemisia</i>	102,41	± 2,1	89,69	± 2,12
<i>Origanum</i>	74,30	± 0,47	63,34	± 1,4

\*em mg equivalentes de ácido Gálico. 100mL<sup>-1</sup> de amostra.

Czamanski (2013), comparando os polifenóis totais dos extratos de engaços de três cultivares de uva da região de Bento Gonçalves-RS, percebeu variação de quantidade de compostos fenólicos entre o tipo de extração (etanólica e hidroetanólica) e com os cultivares utilizados. Observou-se que a atividade antibacteriana teve o melhor resultado nos extratos onde apresentaram maiores níveis de concentração de compostos fenólicos.

## 5. CONCLUSÃO

A ação antibacteriana das extrações de *Artemisia dracunculus* e *Origanum vulgare*, confrontadas com as nove amostras de *Salmonella* spp isoladas de surtos de toxinfecções alimentares no Rio Grande do Sul, demonstrou capacidade significativa de controle em diferentes níveis de concentração dos inóculos. Assim como o uso da técnica de tubos múltiplos com acréscimo de substâncias desestressoras permitiu a observação da bacteriostasia provocada pelos extratos das espécies vegetais.

## REFERÊNCIAS

- AKERELE, O. **Las plantas medicinales**: un tesoro que no debemos desperdiciar. Foro Mundial de la Salud. v. 14, p. 390 – 5, 1993.
- AKERELE, O. **Medicinal plants and primary health care**: an agenda for action. Fitoterapia, Milano, v. LIX. n. 5, p.355-63, 1988.
- ALIGIANNIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINOU, I.B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, v.49, n.9, p. 4168 - 4170, 2001. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/toc/jafcau/49/9/>>. Acesso em 24 mar. 2014.
- ANDRADE, N. J.; MACÊDO, J. A. B. **Higienização na indústria de alimentos**. São Paulo: Varela, 1996.182p.
- ARAÚJO, C. D.; CARVALHO, H. H. C.; SOUTO, S. de A.; SOBREIRO, A. A.; WIEST, J. M. Atividade antibacteriana *in vitro* de extratos de alho nirá (*Allium tuberosum* - Rottler ex Sprengl), sobre agentes de interesse em alimentos. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v.11, p.263 - 268, 2009.
- AVANCINI, C. A. M.; WIEST, J. M. Atividade desinfetante do decocto de *Hypericum caprifoliatum* Cham. Schlecht. *Hypericaceae* (Guttiferae) (“escadinha” /” sinapismo”) frente a diferentes doses infectantes de *Staphylococcus aureus* (agente infeccioso em mastite bovina). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.10, n.1, p.64-69, 2008.
- AVANCINI, C. A. M.; WIEST, J. M.; IRGANG, B. E.; ALMEIDA, J. P.; MUNDSTOCK, E. C. Atividade antibacteriana *in vitro* do decocto de *Hypericum caprifoliatum* Cham. Schlecht. *Hypericaceae* (Guttiferae) – “escadinha” /” sinapismo” – sobre bactérias de interesse em ambientes na área de medicina veterinária. **Ars Veterinária**, v. 18, n. 3, p. 300 – 306, 2002.
- BENLI, M.; KAYA, I.; YIGIT, N. Screening antimicrobial activity of various extracts of *Artemisia dracunculus* L. **Cell Biochemistry and Function**, v. 25, p. 681-186, 2007. Disponível em:<<http://www.interscience.wiley.com>>. Acesso em 20 fev. 2014.
- BONYADIAN, M; MOSHTAGHI, H. BACTERIOCIDAL activity of some plants essential oils against *Bacillus cereus*, *Salmonella Typhimurium*, *Listeria monocitogenes* and *Yersinia enterocolitica*. **Reserch Journal of Microbiology**, v. 3, p. 648-653, 2008. Disponível em: <http://interesjournal.org/IRJM/Pdf/2008/March/Uboh%20et%20al.pdf>. Acesso em 05 mar. 2014.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Farmacopeia Brasileira** V.1, 5. Ed., p. 545, 2010. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd\\_farmacopeia/index.htm](http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/index.htm)>. Acesso em 12 jan. 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004**. Disponível em:< <http://www.anvisa.gov.br> >. Acesso em: 04 de maio de 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos, 2013**. Disponível em: <<http://www.camara.leg.br/atividade-legislativa/...2013/.../view>>. Acesso em: 13 de dezembro de 2013.



CARVALHO, H. H. C.; CRUZ, F.T.; WIEST, J. M. Atividade antibacteriana em plantas com indicativo etnográfico condimentar em Porto Alegre, RS/Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.7, p. 25-32, 2005.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos **in Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Organizadores SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Editora UFRGS. Porto Alegre RS, editora UFSC Florianópolis SC. 2007. 1102p.

CAVALLI-SFORZA, L. Biometrie. Grundzüge biologisch-medizinischer Statistik. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag. 1974. p.201-204.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2011. **CDC Estimates of Foodborne Illness in the United States**: CDC has estimates for two major groups of foodborne illnesses. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/foodborneburden/2011-foodborne-estimates.html>>. Acesso em: 21 fev. 2014.

CHALESHTORI, R. S.; ROKNI, N.; RAZAVILAR, V.; KOPAEI, R. M. The Evaluation of the Antibacterial and Antioxidant Activity of Tarragon (*Artemisia dracunculus* L.) Essential Oil and Its Chemical Composition. **Jundishapur Journal Microbiol**, v. 6, n. 9, p. 1 - 5, 2013. Disponível em: <[http://jjmicrobiol.com/?page=pages&page\\_id=137](http://jjmicrobiol.com/?page=pages&page_id=137)>. Acesso em: 15 mar. 2014.

CORDEIRO, T. S.; PILETTI, R. **Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de Alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e Sálvia (*Salvia officinalis*) para aplicação em alimentos**. 2013. 13f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de tecnologia de alimentos) – Universidade do Extremo Sul Catarinense, SC, 2013. Disponível em: <http://www.repositorio.unesc.net/bitstream/handle/1/1809/Tamires%20Silveira%20Cordeiro.pdf?sequence=1>. Acesso em 10 mar. 2014.

CUNHA, B. **Investigação de surtos alimentares ocorridos em serviços de alimentação no Rio grande do Sul**. 2008. 45f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação) Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.

CZAMANSKI, R.T. **Prospecção de atividade Antibacteriana em resíduos de viticultura na perspectiva da desinfecção em antisepsia aplicada à saúde e à produção animal, bem como à agroindústria Familiar**. 2013. 191 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinária) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, 2013.

DADALIOĞYLU, I.; EVRENDILEK, G. A. Chemical Compositions and Antibacterial Effects of Essential Oils of Turkish Oregano (*Origanum minutiflorum*), Bay Laurel (*Laurus nobilis*), Spanish Lavender (*Lavandula stoechas* L.), and Fennel (*Foeniculum vulgare*) on Common Foodborne Pathogens. **J. Agric. Food Chem**, v. 52, p. 8255-8260, 2004. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/journal/jafcau>>. Acesso em: 15 fev. 2014.

DVG (Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft/ Sociedade Alemã de Medicina Veterinária). **Richtlinien zur Prüfung chemischer Desinfektionsmittel für die Veterinarmedizin/ Normas para a testagem de desinfetantes químicos destinados à medicina veterinária**. Giessen, 1980. In: SCHLIESSER, Th.; STRAUCH, D.

esinfekção in der Tierhaltung, Fleisch- und Milchwirtschaft. Stuttgart: Enke Verlag, 1981. 455p.

EUROPEAN UNION: European Food Safety Authority (EFSA) e European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. **EFSA Journal**, v. 12, n. 2, p. 312, 2014. Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2597.pdf>>. Acesso em: 10 fev. 2014.

FALLER, A.L. K.; FIALHO, E. Disponibilidade de polifenóis em frutas e hortaliças consumidas no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v.43, n.2, p. 211-218, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rsp/v43n2/207.pdf>>. Acesso em: 15 out 2013.

**FARMACOPEIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL**. 2. ed. São Paulo. Indústria Gráfica Siqueira. 1959. P. 331-391.

GIROLOMETTO, G.; AVANCINI, C. A. M.; CARVALHO, H. H. C.; WIEST, J. M. Atividade antibacteriana de extratos de erva mate (*Ilex paraguariensis* A St.Hil.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, p.49 - 56, 2009.

GUIBOURDENCHE, M.; ROGGENTIN P.; MIKOLEIT, M.; FIELDS, P. I.; BOCKEMUHL, J.; GRIMONT, P.A.D.; Weill, F.X. Supplement 2003 e 2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-LeMinor scheme. **Research in Microbiology**, Paris, FR, v.161, p 26-29, 2010. Disponível em <<http://www.elsevier.com/locate/resmic>>. Acesso em: 12 dez. 2013.

GUNDUZ G.T.; GONUL S.A.; KARAPINAR M. Efficacy of oregano oil in the inactivation of *Salmonella typhimurium* on lettuce. **Food Control**, v. 21, p. 513–517, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect-com.ez45.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0956713509002308>>. Acesso em:10 mar. 2014.

KAROU, D.; DICKO M. H.; SIMPORE, J.; TRAORE A. S. Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 8, p. 823 – 828, 2005.

LAVINIKI, V. **Atividade antibacteriana in vitro dos óleos essenciais de canela da china (*Cinnamomun cassia*), orégano (*Origanum vulgare*), pimenta negra (*Piper nigrum*) e tomilho branco (*Thymus vulgaris*) frente à amostras de *Salmonella enterica* isoladas de aves. 2013. 51f.** Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2013. Disponível em <<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/75654/000891722.pdf?sequence=1>> . Acesso em: 19 out. 2013.

LOGENDRA, S. D. M.; RIBNICKY, H.; YANG, A.; POULEV, J.; MA, E. J.; KENNELLY, I. Bioassay-guided isolation of aldose reductase inhibitors from *Artemisia dracuncululus*. **Phytochemistry**, v. 67, p.1539–1546, 2006. Disponível em: <<http://www.elsevier.com/locate/phytochem>>. Acesso em 19 de mai. 2013.

MACIEL, M. J.; PAIM, M. P.; CARVALHO, H. H. C.; WIEST, J. M. Avaliação do extrato alcoólico de hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.) como fator de proteção antibacteriana e antioxidante. **Rev Instituto Adolfo Lutz**. v.71, n. 3, p.462-470, 2012.

MING, L. C. Coleta de Plantas Medicinais. In: DI STASI, L.C. **Plantas medicinais arte e ciência: um guia de estudo interdisciplinar**. UNESP. São Paulo, 1996. p. 69-86.

NORMAN, J. **Ervas e especiarias: origens, sabores, cultivos e receitas**. São Paulo. Publifolha. 336p. 2012.

OLIVEIRA, C. E. V. DE; STAMFORD, T. L. M; GOMES NETO N. J., SOUZA E. L. Inhibition of *Staphylococcus aureus* in broth and meat broth using synergies of phenolics and organic acids. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, p. 312-316, 2010. Disponível em: <[www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro](http://www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro)>. Acesso em: 12 fev. 2014.

OLIVEIRA, T. L. C.; SOARES, R. A.; PICCOLI, R. H. A Weibull model to describe antimicrobial kinetics of oregano and lemongrass essential oils against *Salmonella* Enteritidis in ground beef during refrigerated storage. **Meat Science**, v. 93, n. 3, p.645-651, 2013. Disponível em: <<http://www.journals.elsevier.com/meat-science/>>. Acesso em 15 mar. 2014.

OPAS Organización Panamericana De La Salud. La medicina Tradicional. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana.**, Washington, 108(1), p.77-80, 1990.

PINELA, J.; BARROS, L.; CARVALHO, A.M. FERREIRA, I.C.F.R. Influence of the drying method in the antioxidant potential and chemical composition of four shrubby flowering plants from the tribe Genisteeae (Fabaceae). **Food and Chemical Toxicology**, v.49, p. 2983–2989, 2011. Disponível em: <<http://www.elsevier.com/locate/foodchemtox>>. Acesso em: 08 mar. 2014.

RAEISI, M.; TAJIK, H.; RAZAVI ROOHANI, S. M.; MAHAM, M.; MORADI, M.; HAJIMOHAMMADI, B.; NAGHILI, H.; HASHEMI, M.; MEHDIZADEH, T. Essential oil of tarragon (*Artemisia dracunculus*) antibacterial activity on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in culture media and Iranian white cheese. **Iranian Journal of Microbiology**. v. 4 n. 1, p. 30-33. 4, 2012. Disponível em: <<http://ijm.tums.ac.ir/index.php/ijm/article/view/384.pdf>>. Acesso em 15 mar. 2014.

REYBROUCK, G. The testing of disinfectants. **International Biodeterioration & Biodegradation**. Oxford, v. 41, p. 269-272, 1998.

SANTURIO, J. M.; SANTURIO, D. F.; MORAES, C. FRANCHIN, P. R.; ALVES, S. H. Atividade antibacteriana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37 p. 803-808, 2007.

SHAHRIYARY, L.; YAZDANPARAST, R. Inhibition of blood platelet adhesion, aggregation and secretion by *Artemisia dracunculus* leaves extracts. **Journal of Ethnopharmacology**. v.114, p.194–198, 2007.

SILVEIRA, S. M. DA; CUNHA, A. JÚNIOR; SCHEUERMANN, G. N.; SECCHI, F. L.; VIEIRA, C. R. W. Composição química e atividade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas selecionadas cultivadas no Sul do Brasil contra micro-organismos patogênicos e deteriorantes de alimentos. **Ciência Rural**, v.42, n.7, p.1300-1306, 2012. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782012000700026](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782012000700026)>. Acesso em 14 mar. 2014.

SIMÕES C. M. O. Óleos voláteis IN: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Organizadores SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. 6. ed. Porto Alegre: Editora UFRGS, Florianópolis: editora UFSC. 2007. 1102 p.

SOUZA E. L. DE; STAMFORD, T. L. M.; LIMA, E. O.; BARBOSA, J. M. F.; MARQUES, M. O. M. Interference of heating on the antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum vulgare* L. (*Lamiaceae*) essential oil. **Food Control**, v. 18, p. 409–413, 2007.

SOUZA, A. A.; WIEST, J. M.; Atividade antibacteriana de *Aloysia gratissima* (Gill et Hook) Tronc. (garupá, erva-santa) usada na medicina tradicional no Rio Grande do Sul-Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.9, p.23 - 29, 2007.

STALIKAS, C.D.; Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids (review); **Journal of Separation Science**, v. 30, p. 3268–3295, 2007. Disponível em: <[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/\(ISSN\)1615-9314](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)1615-9314)>. Acesso em: 24 fev. 2014.

STOBART, T. **Ervas, temperos e condimentos de A a Z**. ed. Rio de Janeiro: Jorge Zahar. 2009. 359 p.

VINSON J. A. SU, X.; ZUBIK, L.; BOSE, P. Phenol antioxidant quantity and quality in foods fruits. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5315- 21, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11714322>>. Acesso em 15 out 2013.

## 5 ARTIGO 2

Sensibilidade diagnóstica de *Salmonella* spp. em simulação alimentar com carne moída.

Diagnostic Sensitiveness of *Salmonella* spp. in feed simulation with ground meat.

Giovani Girolometto<sup>1</sup>, José Maria Wiest<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS.

### Resumo

A *Salmonella* spp. é atualmente a bactéria de maior incidência nos sistemas de alimentação e por consequência a que mais causa transtornos de ordem alimentar. Na conduta dos processos de vigilância existe uma demanda muito grande frente a esse patógeno e tem exigido dos agentes envolvidos no controle dessas bactérias uma inovação em relação as técnicas de identificação de *Salmonella*. O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade do teste identificação de *Salmonella*, recomendado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), de reconhecer os verdadeiros positivos, excluindo os falsos negativos, entendido esse fato por Sensibilidade. Para atingir esse objetivo foi necessário fazer alterações no protocolo do teste original acrescentando-se à fase de ativação de *Salmonella* três desestressores (polissorbato de TWEEN 80, Lecitina de soja e histidina) o que permitiu a comparação dos resultados entre os a técnicas sem modificação e com modificação. Para fins de comprovação das hipóteses foi essencial submeter o teste a uma simulação alimentar, para isso foi escolhida a carne bovina moída e acrescentada a ela concentrações de extratos vegetais, representando os estressores bacterianos e cinco amostras de salmonelas em concentrações de  $10^4$  UFC/mL, durante um tempo de 8 e 24 horas de incubação à 25°C. Os resultados alcançados para extrato etanólico de *Artemisia dracuncululus* à concentração de 40 % no teste sem modificação em 8 horas de incubação foi de 73,3%, e em 24 horas, de 40% enquanto que para o teste com modificação foi de 100% em 8 horas e 93,3% em 24 horas. Quando testado o extrato etanólico de *Origanum vulgare* L., na técnica convencional, observou-se que a sensibilidade do teste em 8 horas foi de 93,3% e em 24 horas de 6,6 % e quando submetido ao teste com modificação este foi capaz de identificar em 100% a *Salmonella* tanto em 8 como 24 horas. Os dados encontrados neste trabalho, servem de subsídio à discussão da necessidade de repensar os processos de ativação *Salmonella* spp de alimentos envolvidos em surtos toxinfetivos, constituindo uma melhora na qualificação dos resultados preditivos do teste oficial.

Palavras chaves: Sensibilidade, *Salmonella* spp., desestressores, *Artemisia dracuncululus*, *Origanum vulgare*

## Abstract

*Salmonella spp.* is currently the bacteria of major incidence in food systems and for this reason, the cause of most cases of alimentary infections. The surveillance procedures conduction has a great demand to fight this pathogen and it requires, from the agents involved in the control of those bacteria, innovating techniques for identifying *Salmonella*. The aim of this study was to evaluate the ability of the *Salmonella* identification test recommended by the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA), to recognize the true positives, excluding false negatives. This is called sensitiveness. In order to meet this goal, it was necessary to make some changes in the original test protocol, by adding to the activation phase of the *Salmonella* three de-stressors (TWEEN Polysorbate 80, Soy Lecithin and histidine), which allowed the comparison of results between the techniques, with and without changes. To prove the hypotheses, it was essential to submit the test to a food simulation. In order to this, we chose ground meat added with concentrations of plant extracts, representing bacterial stressors, and five samples of *Salmonella* at concentrations of 10<sup>4</sup> CFU / mL, during a time of 8 and 24 hours of incubation at 25°C. The results achieved in the ethanol extract of *Artemisia dracunculus*, at a 40% concentration for the non modified test was 73.3%, in 8 hours of incubation and 40% in 24 hours, while for the modified test it was 100% in 8 hours and 93.3% in 24 hours. The ethanolic extract of *Origanum vulgare*, when tested in the conventional technique, showed sensitivity of 93.3% in 8 hours and 6.6% in 24 hours and when submitted to the modified test, it was effective in identifying *Salmonella*, 100%, both in 8 or 24 hours. The data found in this work are subsidies to the discussion about the need of reviewing the processes of activation of *Salmonella spp.* in food involved in toxinfection outbreaks, as they are an improvement to qualify the predictive results of the official test.

**Key words:** Sensitiveness, *Salmonella spp.*, de-stressores, *Artemisia dracunculus*, *Origanum vulgare*.

## 1. INTRODUÇÃO

A severidade da ocorrência de infecção por *Salmonella* está ligado à sua capacidade de invasão da parede celular podendo gerar, em alguns casos, quadros bastante severos e até mesmo a morte. Em decorrência disso é que se preconiza a ausência total dessa bactéria em alimento, o que resulta em um problema de saúde pública, já que, por ser um microrganismo com características de adaptação bem desenvolvidas, pode estar numa diversa gama de produtos.

Observando os surtos toxinfetivos alimentares entre os anos de 2000 e 2013, no Brasil, a *Salmonella* spp. foi o agente etiológico isolado de maior incidência, representando 39,39 % dos casos, no entanto, 55,73% das ocorrências de DTA não tiveram o isolamento do agente identificado (BRASIL, 2013). A existência de microrganismos estressados em alimentos e sua recuperação durante procedimentos de cultivo diagnóstico pode representar uma parcela desses mais de 50% de casos não identificados, gerando uma ameaça potencial na segurança alimentar, pelos resultados falsos negativos nas análises microbiológicas, suscitando uma discussão do desenvolvimento de métodos de recuperação pelo uso de desestressores (WU, 2008).

O conceito de bactérias estressadas ou injuriadas refere-se a microrganismos que sofreram efeitos de químicos ou físicos e que os quais não foram efetivos para provocar a morte da célula, deixando-a com dificuldade para a sua multiplicação em meios seletivos específicos (WU e FUNG, 2006). Para melhorar a recuperação dessas bactérias, produtos são adicionados com o objetivo de reagir, neutralizando substâncias desinfetantes e auxiliando no processo de replicação celular (REYBROUCK, 1979).

As plantas condimentares são usadas por suas características sensoriais há muito tempo, no entanto, o estudo de suas propriedades como conservantes naturais de alimentos tem oferecido alternativas a produtos quimicamente sintetizados. Técnicas de preservação natural, com tais ingredientes, estão sob investigação para a sua aplicação futura em produtos alimentícios, com intuito de manter as propriedades organolépticas e estender a vida de prateleira dos mesmos (IRKIN, ABAY; AYDIN, 2011; CORDEIRO, PILETTI, 2013).

*Artemisia dracunculus* L. (estragão) e *Origanum vulgare* L. (orégano) são espécies reconhecidas pelas suas características condimentares, agregando valor a diversos pratos. O estragão tem na culinária francesa um lugar de destaque, porém a sua utilização no Oriente médio e no mundo são comuns. (STOBART, 2009). Quanto ao seu estudo no campo científico tem gerado interesse em diversas áreas como na farmacologia com substâncias sedativas (CHALESHTORI *et al.*, 2013), no tratamento da diabetes (LOGENDRA *et al.*, 2006) e na coagulação do sangue (SHAHRIYARY, YAZDANPARAST, 2007). No entanto, a atividade antibacteriana tem tido destaque pela característica de seu uso em alimentos (RAEISI *et al.*, 2012; CHALESHTORI *et al.*, 2013).

*Origanum vulgare* L. “orégano” é uma planta condimentar amplamente conhecida que leva o nome genérico de orégano, empregado em diversas plantas que tem familiaridade de compostos aromáticos, principalmente o carvacrol e o timol, (SIMÕES *et al.*, 2007; KINTZIOS, 2004). A ação antimicrobiana frente a patógenos alimentares tem recebido um crescente interesse por vários pesquisadores BARROS *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2010, SILVEIRA *et al.*, 2012).

Este estudo tem por finalidade comparar a Sensibilidade do teste oficial para o diagnóstico de *Salmonella* spp., recomendado pelo Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), através da introdução de desestressores bacterianos na fase de ativação da bactéria. Para isso, utilizou-se concentrações de extratos de *Artemisia dracunculus* e *Origanum vulgare* sobre a *Salmonella* isolada de surtos toxinfetivos alimentares, criando condições de bacteriostasia que podem afetar os resultados diagnósticos do teste ocasionando respostas falso-negativas.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Espécies vegetais utilizadas



*Artemisia dracunculus* L. – *ASTERACEAE* (estragão) foi colhida em propriedade de produção orgânica localizada no bairro Lami, em Porto Alegre (coordenadas 30°13' S e 51°04' O). Já o *Origanum vulgare* L. - *LAMIACEAE* (orégano) foi colhido em propriedade particular de produção urbana agroecológica, no bairro Boa Vista, em Porto Alegre (coordenadas 30°01' S e 51°10').

As plantas foram caracterizadas e identificadas botanicamente, a partir de exsiccatas segundo Ming (1996), e encaminhadas para identificação botânica e registro no Herbário do Departamento de Botânica, do Instituto de Biologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, recebendo numeração: ICN 17616 (Estragão/Lami) e ICM 165042 (Orégano/Boa Vista).

## 2.2. Produção dos extratos vegetais.

Para a elaboração dos extratos vegetais, utilizou-se toda a parte aérea das plantas (ramos, folhas e flores), colhidas no período de primavera e verão de 2012 e 2013 e como solução extratora o álcool etílico produzido através da fermentação de cereais (FARMAQUIMICA<sup>®</sup>, Porto Alegre, Brasil). A planta para confecção dos extratos foi trabalhada na sua forma *in natura*, recém colhida, tendo sido triturada e colocada em maceração com álcool etílico a 96°GL (Gay Lusac), na proporção de 400g da planta para 1000mL do solvente (FARMACOPÉIA, 1959). Esses extratos foram guardados em vidros com rosca, vedados e abrigados da luz, sendo agitados periodicamente ficando no mínimo 15 dias em maceração.

Para a retirada da porção alcóolica do extrato, foi submetido ao evaporador rotativo com temperatura de 60°C, entre 50 e 40rpm, sob pressão negativa de 600mm/Hg (BRASIL, 2010). O resultado desta extração foi considerado como a concentração 100%.

Fez-se o controle da esterilidade dos extratos, a cada processo de extração, retirando-se uma alíquota de 05mL e colocando-a em tubos com caldo BHI (Brain Heart Infusion - Himedia<sup>®</sup>, Monbai, Índia), incubados a 37°C, por 24 e 48 horas. O

resultado foi confirmado por inoculação em placas de Petry com ágar nutriente, verificando-se a presença ou não do crescimento de microrganismos.

### 2.3. Amostras bacterianas

Foram utilizadas quatro amostras de *Salmonella enterica*, selecionadas de forma intencional dentre isolados de surtos toxinfetivos no Rio Grande do Sul (Tabela 01), acrescidas de padrão internacional *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076). Os isolados foram cedidos pelo Laboratório Central do Estado (LACEM).

Tabela 01. Surtos toxinfetivos alimentares no Rio Grande do Sul, Brasil, entre 2011 e 2012, que tiveram salmonelas isoladas de alimentos de origem animal.

<i>Salmonella</i> amostra	Datado surto	Alimento incriminado	Município	Pessoas envolvidas
<i>S. Infantis</i>	08/10/2011	Sanduíche	Triunfo	74
<i>S. Derby</i>	25/01/2012	Linguiça suína	Gramado	12
<i>S. Enteritidis</i>	25/01/2012	Burguer carne e vegetais	Porto Alegre	1030
<i>S. Braenderup</i>	19/03/2012	Salame caseiro	Uruguaiana	16

Fonte: Formulário para notificação de surto de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA). Programa de Vigilância Epidemiológica de DTA. Secretaria Estadual da Saúde/Centro de Controle de DTA. Governo do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

As bactérias permaneceram na bacterioteca do Laboratório de Higiene do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA) da UFRGS e foram mantidas em cultura BHI ágar (Merck®, Darmstadt, Germany) sob refrigeração com repliques quinzenais.

### 2.4. Reativação e diluição serial logarítmica

A reativação das bactérias aconteceu com a retirada de uma alíquota das colônias em estoque na bacterioteca, que foi repassada para tubos de ensaio, contendo 05ml de caldo BHI e incubada a 37°C por 18 a 24 horas. No dia seguinte, a partir do tubo ativado, transferiu-se 01 mL dessa cultura bacteriana para um tubo de ensaio contendo 09ml de água destilada estéril, formando a primeira diluição ( $10^{-1}$  UFC/mL) e assim, sucessivamente, até atingir-se o oitavo tubo, referente a  $10^{-8}$  UFC/mL. Dessa forma logarítmica, constituiu-se concentrações bacterianas controladas, formando sucessivas diluições com diferença, entre elas, de um fator logarítmico (AVANCINI *et al.*, 2002; AVANCINI; WIEST, 2008).

Para aferição da contagem populacional bacteriana, foi realizada a semeadura de 100 $\mu$ L das duas últimas diluições ( $10^{-7}$  e  $10^{-8}$  UFC /mL), em placas de Petry com ágar BHI (Himedia<sup>®</sup>, Monbai, India), espalhando de maneira uniforme com alça de Drigalski, deixando-as por 24 horas em estufa a 37°C para contagem de colônias. Só foram utilizados os inóculos que, na diluição  $10^{-7}$ , apresentaram no mínimo 10 e no máximo 100UFC/mL, segundo técnica biométrica de Cavalli-Sforza (1974).

## 2.5. Modelo cárneo utilizado para o estudo

Como meio de cultura para as salmonelas, simulando uma formulação alimentar, foi utilizado um modelo de carne bovina moída, da porção traseira do corte denominado de coxão mole, formado por diversos músculos: sartório, reto interno, pectíneo, adutor, semimembranoso, gêmeos, obturador externo, obturador interno e quadrado femoral (BRASIL, 1988). Esse produto foi adquirido em casa comercial licenciada e especializada para atender a demanda. A carne moída foi levada ao Laboratório de Higiene do Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos (ICTA) na UFRGS onde foi assepticamente dividida em alíquotas de 200g, colocadas em sacos plásticos e estocada em congelador em temperatura de -18°C, por um período não superior a seis meses.

Para verificação da qualidade microbiológica da carne, amostras foram submetidas à análise realizadas pelo laboratório do Centro de Ensino, Pesquisa e Tecnologia de Carnes na Faculdade de Veterinária da UFRGS. As análises foram realizadas conforme protocolo para esse tipo de produto e confrontadas conforme

parâmetros microbiológicos recomendados pela RDC n°12, de 2001, da ANVISA (BRASIL, 2001).

## 2.6. Processo de execução do experimento

No primeiro dia a carne foi retirada do freezer e colocada para descongelar em refrigerador com temperatura oscilando entre 04 a 08°C por um período de 24 a 30 horas. Nesse mesmo dia foi iniciado o processo de reativação dos inóculos.

No segundo dia, no primeiro momento, realizou-se a evaporação do álcool dos extratos através de evaporador rotativo. Logo em seguida, iniciou-se o processo de diluição serial logarítmica do inóculo, conforme descrito no item 2.4.

O procedimento de montagem do experimento foi iniciado com a pesagem da carne e a armazenagem em sacos específicos, depois acrescentou-se o extrato da planta e seguiu-se para a agitação em Stomacher® (Seward®, Worthing, Reino Unido) por 30 segundos. Em seguida, introduziu-se a dose desafio de *Salmonella* spp. e, novamente, agitou-se a solução que formou uma amostra de teste na concentração final de  $\log_{10}^4$ . Ao final, cada amostra foi colocada em Incubadora de Demanda Biológica de Oxigênio (DBO) (Instrulab®, Porto Alegre, Brasil), onde permanecia até serem concluídos os dois períodos de leitura (08 e 24 horas) a carne com o extrato das plantas e inóculo. O peso final da amostra de alimento sempre atingiu uma quantidade aproximada de 200g, o que é a recomendação mínima para análise de alimentos em laboratório (BRASIL, 2001).

A escolha do tipo de extração e a concentração de extrato para cada uma das espécies foi determinado conforme análise de tubos múltiplos que resultou em concentrações de extrato diferentes para cada espécie vegetal (GIROLOMETTO, 2014). Ficando a relação da mistura da seguinte maneira:

- estragão 40% = 100g de Carne, 80mL de extrato e 20mL de inóculo;
- orégano 45% = 90g de Carne, 90mL de extrato e 20mL de inóculo.

## 2.7. Procedimento para realização da identificação de *Salmonella* spp.

O teste de identificação de *Salmonella* spp., proposto pela legislação oficial e seguido pelos laboratórios que fazem o isolamento em alimentos oriundos de surtos toxinfetivo alimentares, está descrito na Instrução Normativa N°62, de 26 de agosto de 2003 (BRASIL, 2003).

A primeira fase do teste, chamada de pré-enriquecimento, tem como objetivo criar uma condição de recuperação das bactérias que podem encontrar-se inibidas, injuriadas ou estressadas no alimento. Nessa fase, foram originados dois testes em que um mantém as características normais (sem modificação) e outro sofreu uma modificação pela adição de desestressores (com modificação).

Preparou-se dois frascos com 225mL de água peptonada tamponada a 1% (Merck® Darmstadt, Germany), sendo que em um deles foi acrescentado os desestressores na proporção de 3% de polissorbato de TWEEN 80 (Synth®, Diadema, Brasil), 0,3% de Lecitina de soja (Delaware®, Porto Alegre, Brasil) e 1% de histidina (Synth®, Diadema, Brasil).

Retirou-se pequenas porções de carne do modelo experimental até atingir 25g, colocando-os assepticamente em saco plástico e somando-se a ele 225mL de água peptonada. A solução foi homogeneizada, através de Stomacher®, por um minuto e incubada a 37°C por no mínimo 16 e no máximo 20h.

Na fase seguinte, relativa aos enriquecimentos seletivos, retirou-se uma alíquota de 0,1mL do líquido pré-enriquecido e foi passada para tubo com 9,9mL de RV (Rapaport-Vassiliadis, Merck®, Darmstadt, Germany) e 01mL para tubo com 9mL de TT (Tetrationato, Merck®, Darmstadt, Germany), resultando em dois tubos (RV e TT) que representam a ausência de desestressores. Isso se repetiu em outros dois tubos representando a sua presença. Esses quatro tubos foram colocados em banho-maria com agitação a 42°C por um período de 24h.

O processo seguinte consistiu em retirar 10µL de cada um dos tubos e semeá-los em placas de Petry pela técnica de esgotamento em dois meios distintos, para identificação e o isolamento das colônias. Foram eleitos para o plaqueamento o Agar Xylose-Lysine-Tergitol 4 (XLT4 - Merck®, Darmstadt, Germany) e o Agar Brilliant-green Phenol-red Lactose Sucrose (BPLS Merck® Darmstadt, Germany) para leituras

(BRASIL 2003). Essas Placas foram incubadas a 37°C por um período de 24 a 30 horas. Foram consideradas positivas as placas que possuísem pelo menos uma colônia característica em pelo menos um dos meios.

## 2.8. Análises dos dados

A validade operacional dos instrumentos de diagnóstico deve estar sujeita à avaliação sistemática para poder estabelecer maior confiabilidade a um teste. Para isso, deve existir um padrão contra o qual seja possível realizar estudos comparativos do desempenho dos testes (ALMEIDA FILHO, ROUQUAYROL, 2006).

Sendo assim, na tentativa de avaliar a pesquisa de *Salmonella* pela técnica preconizada pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), foi estabelecida uma modificação na técnica, acrescentando desestressores para criar um teste de comparação (teste ouro), dessa forma criando um padrão de referência para identificar os resultados como positivos verdadeiros (OPAS, 1997).

Através deste delineamento experimental, foi possível fazer o cálculo da sensibilidade dos testes, ou seja, medir a capacidade de serem reconhecidos os verdadeiros resultados positivos, sendo considerado ideal o que for capaz de identificar todos que forem os realmente positivos nas populações ou mesmo nas amostras alimentares testadas (100% sensível).

A técnica preconizada pelo MAPA é essencialmente dicotômica, expressa pela presença ou ausência da *Salmonella* em 25g da amostra, desconsiderando a probabilidade da presença de inibição expressa em resultado falso negativo.

Para o cálculo da sensibilidade foi utilizada a seguinte equação, segundo Côrtes (1993):

$$\text{Sensibilidade (S)} = \frac{\text{VP}}{(\text{VP} + \text{FN})} \times 100$$

VP (Verdadeiro Positivos) = representa o número de amostras que o método foi capaz de identificar como positivos entre aqueles efetivamente contaminados.

FN (Falsos Negativos) = representa o número de amostras efetivamente contaminadas que o método considerou como negativas.

Foram realizados testes com 03 repetições independentes entre si, com concentrações de extratos de orégano a 45% e concentrações de extrato de estragão a 40% e densidade populacional de inóculo padrão final de  $10^4$  UFC/mL.

### 3. RESULTADOS

Analisando a Tabela 02 pode-se perceber o comportamento diferenciado dos sorovares de *Salmonella enterica* frente aos extratos. Avaliando o extrato de estragão percebe-se que a *S. Derby* teve, nas três repetições, resultados falsos negativos nos tempos de contato de 08 e 24 horas. A mesma bactéria frente ao extrato de orégano teve o maior número de falsos negativos. Três repetições foram negativas com a técnica sem modificação. Em uma das repetições do teste com modificação, um resultado foi negativo, o que pode estar relacionado à ação bactericida residual do extrato frente à bactéria.

A *S. Enteritidis*, padrão internacional (ATCC 13076), foi a amostra que teve a maior resistência aos extratos, apresentando maior sensibilidade aos testes. Essa bactéria demonstrou crescimento positivo em todas as variações dos experimentos com exceção no teste de orégano em 24h que resultou em dois testes falsos negativos, justificando salvo melhor juízo a sua condição de padrão.

Tabela 02: Nível de Sensibilidade da técnica dos testes de pesquisa de *Salmonella* spp. Segundo Instrução Normativa nº62, de 26 de agosto de 2003 com e sem modificação pelo acréscimo de desestressores, com cinco amostras de *Salmonella enterica*, em modelo cárneo, simulando alimento com extratos de plantas, incubado a 25°C, com tempo de 08 e 24 horas sobre densidade populacional bacteriana de 10<sup>4</sup> UFC/ml.

Concentração*	<i>Artemisia dracunculus</i>				<i>Origanum vulgare</i>				
	40 %				45%				
	8 horas		24 horas		8 horas		24 horas		
Teste	C	S	C	S	C	S	C	S	
<i>S. Derby</i>	1	+	-	+	-	+	-	+	-
	2	+	-	-	-	+	+	+	-
	3	+	-	+	-	+	+	+	-
<i>S. Enteritidis</i>	1	+	+	+	-	+	+	+	-
	2	+	+	+	+	+	+	+	-
	3	+	+	+	-	+	+	+	-
<i>S. Infantis</i>	1	+	+	+	-	+	+	+	-
	2	+	-	+	-	+	+	+	-
	3	+	+	+	-	+	+	+	-
<i>S. Branderup</i>	1	+	+	+	+	+	+	+	-
	2	+	+	+	+	+	+	+	-
	3	+	+	+	-	+	+	+	-
<i>S. Enteritidis</i>	1	+	+	+	+	+	+	+	
ATCC 13076	2	+	+	+	+	+	+	+	-
	3	+	+	+	+	+	+	+	-
VP		15	11	14	6	15	14	15	1
FN		0	4	1	9	0	1	0	14
Sensibilidade do teste (%)		100	73,3	93,3	40	100	93,3	100	6,6

Concentração do extrato da planta em relação a quantidade de carne. C com modificação da técnica (desestressores). S sem modificação da técnica (sem desestressores). (+) presença de *Salmonella* em 25g; (-) ausência de *Salmonella* em 25g. VP (Verdadeiro Positivo) e FN (Falso Negativo).

Em relação ao teste com o extrato de estragão, observou-se, nos experimentos com modificações, que no tempo de 08 horas todos os resultados foram positivos, ou seja, confirmou-se a presença de *Salmonella* em 25g de alimento. Ao analisar-se, no tempo de 24 horas, apenas um dos testes deu resultado negativo assumindo sensibilidade de 93,3%. No momento em que foi realizada a avaliação dos testes sem a modificação, percebemos que os valores diminuiriam sensivelmente no número de testes positivos. Dessa forma, no tempo de 08 horas, a sensibilidade foi de 73,33% e, em 24 horas, foi de apenas 40%.

Avaliando a ação da solução de orégano, os resultados dos testes tanto em 08 como em 24 horas, tiveram 100% de sensibilidade para identificar a presença de



*Salmonella* spp. em 25g de alimento. No entanto, os testes sem modificação apresentaram comportamento distinto. Nesse caso, em 08 horas, a sensibilidade de identificação de *Salmonella* foi de 93,3% e, em 24 horas, de apenas 6,66%.

#### 4. DISCUSSÃO

Ao se confrontar microrganismos com estratégias de controle em alimento, estas obtidas por meio de processos químicos ou físicos, se esses processos não forem totalmente efetivos, podem causar danos às estruturas biológicas da microbiota sem levar a sua inativação, criando um processo de danificação ou estresse (WU; FUNG, 2006). Em consonância com essa afirmação, Bozoglu, Alpas e Kaletunc (2004) classificaram a população de microrganismos, após um tratamento físico ou químico não satisfatório, em três grupos que incluem: as células mortas (letalmente ou irreversivelmente lesionadas); células sem lesão (células normais ou viáveis) e células danificadas (subletais estressadas ou de lesão reversível).

Considerando os resultados aqui apresentados (Tabela 02 e 03), em relação aos testes com a técnica do MAPA sem modificação, percebeu-se diminuição da identificação efetiva de *Salmonella*. Nos tempos de contato do extrato com a carne (08 e 24 horas), evidenciou-se que, em algumas repetições, não houve recuperação das bactérias, principalmente no tempo de atuação de 24 horas. Essa observação foi possível devido ao uso de desestressores no teste com modificações, pois esse na técnica oficial possibilitou identificar falsos negativos. Tal identificação foi possível porque, considerando-se as mesmas condições, o não crescimento no teste padrão contradiz-se ao crescimento no teste com desestressores, evidenciando a falsa negatividade presente.

Em experimento com diversos microrganismos, entre eles a *Salmonella*, Wu (2008) demonstrou a importância de escolher um método de diagnóstico que seja efetivo na reativação do agente etiológico, pois comprovou que alguns meios seletivos têm dificuldade em ativar essa categoria de células que estão danificadas ou estressadas.

A quantidade de *Salmonella* necessária para causar infecção está em aproximadamente  $10^5$  células, porém, já foram relatados casos com valores de  $10^3$  e  $10^2$

UFC/g, o que pode depender do tipo de alimento, do sorovar e da condição de susceptibilidade do indivíduo infectado (JAY, 2009; D'AOUST; PINIK, 1976; HUMPHREY, 2004). Pesquisa realizada com *Salmonella* spp. isoladas de surtos toxinfetivos no Rio Grande do Sul, quantificou a carga bacteriana nos alimentos incriminados, demonstrando concentrações de inóculos de até  $3 \times 10^2$  MMP/g<sup>-1</sup> (MÜRMMANN *et al.*, 2008).

No que se refere ao padrão oficial, a *Salmonella* é uma bactéria que por sua alta capacidade de causar infecção não é tolerada em alimento em nenhuma quantidade (BRASIL, 2003). Seguindo essa reflexão, a dose infectante que foi empregada no experimento ( $10^4$  UFC/ml<sup>-1</sup>) condiz com a realidade possível de que o produto utilizado no experimento, inoculado com essa concentração de *Salmonella*, possa causar doença se for ingerido.

Resultados muito semelhantes aos aqui observados foram apresentados por Carvalho *et al.* (2006) ao testar *Artemisia dracuncululus* (estragão) frente a *Salmonella* Enteritidis. No caso do experimento citado, foi criada condição de simulação de alimento com leite e BHI, acrescentando o extrato aquoso de *Artemisia dracuncululus* a 50% e submetendo a técnica oficial do MAPA. Nesse estudo, os autores perceberam que a *Salmonella* se encontrou inibida pelo extrato de estragão uma vez que apresentou resultado positivo em teste com desestressores e negativo nos testes sem desestressores, sendo as condições do experimento iguais nos dois modos. Ainda, segundo os autores, isso poderia ser um indicativo de um falso negativo que em condições reais pode interferir na identificação com algum produto alimentar que contenha o condimento na sua composição.

Isto posto pode-se levantar a hipótese de que uma parcela destes surtos sem identificação de agentes, o que representa mais da metade dos casos avaliados, poderia ser atribuído a presença de falsos negativos, pois se percebe que existe uma interferência quando aplicados os extratos vegetais no modelo cárneo.

Pinto e Bergmann (2002) reforçam a necessidade de melhorias nos processos de investigação epidemiológica, enfatizando melhor os sinais clínicos, recordatório alimentar, incluindo condimentação e técnicas de preparo na ótica de gastronomia étnica.

## 5. CONCLUSÃO

A introdução de desestressores na primeira fase de teste recomendado pelo MAPA mostrou ser capaz (nas condições do experimento) de identificar salmonelas que estão em situação de bacteriostasia, ocasionada por adição de extratos de *Artemisia dracunculus* e *Origanum vulgare* em preparação alimentar com carne moída. Ou seja, os resultados salientam a dificuldade do teste padrão convencional em conseguir ativar plenamente as bactérias estressadas.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA FILHO, N. DE A. & ROUQUAYROL, M. Z. **Introdução a Epidemiologia**. 4º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogam, 2006. 282p.
- AVANCINI, C. A. M.; WIEST, J. M. Atividade desinfetante do decocto de *Hypericum caprifoliatum* Cham. Schlecht. *Hypericaceae* (Guttiferae) (“escadinha” /” sinapismo”) frente a diferentes doses infectantes de *Staphylococcus aureus* (agente infeccioso em mastite bovina). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.10, n.1, p.64-69, 2008.
- AVANCINI, C. A. M.; WIEST, J. M.; IRGANG, B. E.; ALMEIDA, J. P.; MUNDSTOCK, E. C. Atividade antibacteriana *in vitro* do decocto de *Hypericum caprifoliatum* Cham. Schlecht. *Hypericaceae* (Guttiferae) – “escadinha” /” sinapismo” – sobre bactérias de interesse em ambientes na área de medicina veterinária. **Ars Veterinária**. v. 18, n. 3, p. 300 – 306, 2002.
- BARROS, C. J.; CONCEIÇÃO, L. M.; NETO, G. N. J.; COSTA, V. A. C.; SIQUEIRA, J. P.; BASÍLIO JR., I. D.; SOUZA, E.L. Interference of *Origanum vulgare* L. essential oil on the growth and some physiological characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. **LWT - Food Science and Technology**, v.42, n. 6, p. 409 - 413, 2009. Disponível em :< <http://www.journals.elsevier.com/food-control>>. Acesso em: 24 mar. 2014.
- BOZOGLU, F.; ALPAS, H.; KALETUNC, G. Injury recovery of foodborne pathogens in high hydrostatic pressure treated milk during storage. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v.40, n. 3, p. 243-247, 2004. Disponível em: <<http://www-periodicos-capes-gov-br.ez45.periodicos.capes.gov.br>>. Acesso em: 10 mar. 2014.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Farmacopeia Brasileira** V.1, 5. Ed., p. 545, 2010. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd\\_farmacopeia/index.htm](http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/index.htm)>. Acesso em 12 jan. 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **RDC Nº 12, de 2 de janeiro de 2001**. Disponível em: <[http://www.portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RDC\\_12\\_2001.pdf?MOD=AJPERES](http://www.portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RDC_12_2001.pdf?MOD=AJPERES)>. Acesso em 03 abr. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Portaria Nº 5, de 08 de novembro de 1988**. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=6496>>. Acesso em 16 dez. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa Nº 62, de 26 de agosto de 2003**. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2851>>. Acesso em: 12 out. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos, 2013**. Disponível em: <<http://www.camara.leg.br/atividade-legislativa/...2013/.../view>>. Acesso em: 13 de dezembro de 2013.

CARVALHO, H. H. C.; WIEST, J. M.; GRECO, D. P. Atividade antibacteriana e a preditividade do condimento *Artemisia dracunculus* Linn. (*Asteraceae*), variedade inodora – estragão – frente a *Salmonella* sp. **Revista Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 75-79, 2006.

CAVALLI-SFORZA, L. Biometrie. Grundzüge biologisch-medizinischer Statistik. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag. 1974. p.201-204.

CHALESHTORI, R. S.; ROKNI, N.; RAZAVILAR, V.; KOPAEI, R. M. The Evaluation of the Antibacterial and Antioxidant Activity of Tarragon (*Artemisia dracunculus* L.) Essential Oil and Its Chemical Composition. **Jundishapur Journal Microbiol**, v. 6, n. 9, p. 1 - 5, 2013. Disponível em: <[http://jjmicrobiol.com/?page=pages&page\\_id=137](http://jjmicrobiol.com/?page=pages&page_id=137)>. Acesso em: 15 mar. 2014.

CORDEIRO, T. S.; PILETTI, R. **Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de Alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e Sálvia (*Salvia officinalis*) para aplicação em alimentos**. 2013. 13f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de tecnologia de alimentos) – Universidade do Extremo Sul Catarinense, SC, 2013. Disponível em: <http://www.repositorio.unesc.net/bitstream/handle/1/1809/Tamires%20Silveira%20Cordeiro.pdf?sequence=1>. Acesso em 10 mar. 2014.

CÔRTEZ, J. de A. **Epidemiologia: conceitos e princípios fundamentais**. São Paulo: Varela. 1993. 227p.

D'AOUST, J. Y.; PIVNICK, H. Letter: Small infectious doses of *Salmonella*. **The Lancet**, v.1. p. 866, 1976.

**FARMACOPEIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL**. 2. ed. São Paulo. Indústria Gráfica Siqueira. 1959. P. 331-391.

GIROLOMETTO, G. **Relação entre salmonelas isoladas de alimentos e extratos de plantas condimentares, na perspectiva de atividade antibacteriana e preditividade**

**diagnóstica**. 2014. 113f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2014.

HUMPHREY T. *Salmonella*, stress responses and food safety. **Nature Reviews Microbiology**. v.2, n. 6, p. 504-509, 2004.

IRKIN, R.; ABAY, S.; AYDIN; F. Inhibitory Effects of Some Plant Essential Oils Against *Arcobacter butzleri* and Potential for Rosemary Oil as a Natural Food Preservative. **JOURNAL OF MEDICINAL FOOD**, v. 14 n. 3, p. 291–296, 2011. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com.ez45.periodicos.capes.gov.br/doi/pdf/10.1089/jmf.2010>>. Acesso em 15 mar. 2014.

Jay, M. J. **Microbiologia dos Alimentos**, Porto Alegre: Artmed, 6 edição. 2005. 711p.

KINTZIOS, S.E. **Oregano: the Genera *Origanum* and *Lippia***. Ed. Taylor e Francis Group. 2004.

LOGENDRA, S. D. M.; RIBNICKY, H.; YANG, A.; POULEV, J.; MA, E. J.; KENNELLY, I. Bioassay-guided isolation of aldose reductase inhibitors from *Artemisia dracunculus*. **Phytochemistry**, v. 67, p.1539–1546, 2006. Disponível em: <<http://www.elsevier.com/locate/phytochem>>. Acesso em 19 de mai. 2013.

MING, L. C. Coleta de Plantas Medicinais. In: DI STASI, L.C. **Plantas medicinais arte e ciência: um guia de estudo interdisciplinar**. UNESP. São Paulo, 1996. p. 69-86.

MÜRMAN, L.; SANTOS, M. C DOS; LONGARAY, S. M.; BOTH, J. M. C.; CARDOSO, M. Quantification and molecular characterization of *Salmonella* isolated from food samples involved in salmonellosis outbreaks in Rio Grande do Sul, Brazil. **Brasilian Journal of Microbiology** v. 39, p. 529-534, 2008. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1517-3822008000300024&script=sci\\_arttext&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1517-3822008000300024&script=sci_arttext&tlng=pt)>. Acessado em: 22 dez. 2013.

OLIVEIRA, C. E. V. DE; STAMFORD, T. L. M; GOMES NETO N. J., SOUZA E. L. Inhibition of *Staphylococcus aureus* in broth and meat broth using synergies of phenolics and organic acids. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, p. 312-316, 2010. Disponível em: <[www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro](http://www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro)>. Acesso em: 12 fev. 2014.

OPAS Organizacion Panamericana De La Salud. **Métodos de investigação epidemiológica em doenças transmissíveis**. Brasília [s.n. ].v.1, 1997.181p.

PINTO, A.T.; BERGMANN, G. P. Investigação de enfermidades transmitidas por alimento. **Higiene Alimentar**, v. 14, n. 74, p. 21 – 24, 2002.

RAEISI, M.; TAJIK, H.; RAZAVI ROOHANI, S.M.; MAHAM, M.; MORADI, M.; HAJIMOHAMMADI, B.; NAGHILI, H.; HASHEMI, M.; MEHDIZADEH, T. Essential oil of tarragon (*Artemisia dracunculus* L.) antibacterial activity on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in culture media and Iranian white cheese. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 4, n.1, p 30 -33, 2012. Disponível em: <<http://ijm.tums.ac.ir/index.php/ijm>>. Acesso em: 10 mar. 2014.

REYBROUCK, G. Efficacy of inactivators against 14 disinfectant substances. *Bakteriologie und Hygiene. Zentralblatt: Abt. Orig. B.*, Berlin, v. 68<sup>a</sup>, p. 480 – 492, 1979.

SHAHRIYARY, L.; YAZDANPARAST, R. Inhibition of blood platelet adhesion, aggregation and secretion by *Artemisia dracunculus* leaves extracts. **Journal of Ethnopharmacology**. v.114, p.194–198, 2007.

SILVEIRA, S. M. DA; CUNHA, A. JÚNIOR; SCHEUERMANN, G. N.; SECCHI, F. L.; VIEIRA, C. R. W. Composição química e atividade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas selecionadas cultivadas no Sul do Brasil contra micro-organismos patogênicos e deteriorantes de alimentos. **Ciência Rural**, v.42, n.7, p.1300-1306, 2012. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782012000700026](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782012000700026)>. Acesso em 14 mar. 2014.

SIMÕES C. M. O. Óleos voláteis IN: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Organizadores SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. 6. ed. Porto Alegre: Editora UFRGS, Florianópolis: editora UFSC. 2007. 1102 p.

STOBART, T. **Ervas, temperos e condimentos de A a Z**. ed. Rio de Janeiro: Jorge Zahar. 2009. 359 p.

WHO (World Health Organization). **Foodborne Disease Surveillance; Burden of foodborne diseases 2013**. Disponível em: <[http://www.who.int/foodsafety/foodborne\\_disease/ferg/en/index6.html](http://www.who.int/foodsafety/foodborne_disease/ferg/en/index6.html)>. Acesso em: 22 fev. 2014

WU, V. C. H. A review of microbial injury and recovery methods in food. **Food Microbiology**. v.25 p. 735- 744 (2008). Disponível em:< [www.elsevier.com/locate/fm](http://www.elsevier.com/locate/fm)>. Acesso em 15 nov. 2013.

WU, V. C. H.; FUNG, D. Y. C. Simultaneous recovery and detection of four heat-injured foodborne pathogens in ground beef and milk by a four-compartment thin agar layer plate. **Journal of Food Safety**. v. 26, p. 126–136, 2006. Disponível em: <[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1745-4565](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1745-4565)>. Acesso em: 15 mar.2014.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A escolha da técnica de tubos múltiplos com a utilização de desestressores mostrou ser capaz de identificar a ação seletiva dos extratos sobre as salmonelas testadas, permitindo quantificar as concentrações dos inóculos determinando o momento de bacteriostasia e bacteriocidia e admitindo que esses dados possam evidenciar a presença de falsos negativos no experimento.

Outra situação importante foi percebida quanto à utilização de extratos etanólicos, que demonstraram atividade bactericida e bacteriostática maior, assim como os níveis de polifenóis totais. Já os extratos hidroetanólicos tiveram resultados da atividade biológica menores e níveis de polifenóis mais baixos.

Os testes de Sensibilidade realizados – acrescidos de desestressores na técnica oficial do MAPA- foram eficazes pois conseguiram, em quase todas as repetições, apresentar a *Salmonella* no alimento simulado evidenciando, desse modo, a fragilidade do método convencional em ativar bactérias que tenham passado por processos estressantes, como antimicrobianos naturais.

As observações, até o momento, permitem fazer a reflexão sobre a necessidade de melhorar o processo de diagnóstico utilizado para identificação de *Salmonella* spp. Os resultados aqui encontrados podem ser utilizados como subsídios concretos para elucidar uma percentagem tão elevada de agentes não identificados nos casos de surtos toxinfetivos, podendo servir de balizador para futuras investidas nessa situação.

## REERÊNCIAS

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. Vol. I Bacteriosis y Micosis. Tercera Edición. Washington, Oficina Sanitária Panamericana. Organizacion Mundial de La Salud. Publicação Técnica n. 580. 2001.

AGRANOVSKI, V.; RISTOVSKI, Z.; HARGREAVES, M.; BLACKALL, P.; MORAWSKA, L. Performance evaluation of the UVAPS: influence of physiological age of airborne bacteria and bacterial stress. **Journal of Aerosol Science**, v. 34, p. 1711-1721, 2003. Disponível em: <[www.elsevier.com/locate/jaerosc](http://www.elsevier.com/locate/jaerosc)>. Acesso em: 29 mar. 2014.

AKERELE, O. **Las plantas medicinales**: un tesoro que no debemos desperdiciar. Foro Mundial de la Salud. v. 14, p. 390 – 5, 1993.

AKERELE, O. **Medicinal plants and primary health care**: an agenda for action. Fitoterapia, Milano, v. LIX. n. 5, p.355-63, 1988.

ALIGIANNIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINOU, I.B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, v.49, n.9, p. 4168 - 4170, 2001. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/toc/jafcau/49/9/>>. Acesso em 24 mar. 2014.

ALMEIDA FILHO, N. DE A. & ROUQUAYROL, M. Z. **Introdução a Epidemiologia**. 4º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogam, 2006. 282p.

ALMEIDA, J. C.; PAULA, C. M. S.; SVOBODA, W. K.; LOPES, M. O.; PILONETTO, M. P.; ABRAHÃO, W. M.; E. C. GOMES. Perfil epidemiológico de casos de surtos de doenças transmitidas por alimentos ocorridos no Paraná, Brasil. **Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina**, v. 34, n. 1, p. 97-106, 2013. Disponível em: <<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/seminabio/article/view/13096>>. Acesso em: 15 mar. 2014.

AMSON G. V.; HARACEMIV, S. M. C.; MASSON, M. L. Levantamento de dados epidemiológicos relativos à ocorrências de surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) no estado do Paraná – Brasil, no período de 1978 a 2000. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 30, n. 6, p. 1139-1145, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cagro/v30n6/a16v30n6.pdf>>. Acesso em: 12 jan. 2014.

ANDRADE, N. J.; MACÊDO, J. A. B. **Higienização na indústria de alimentos**. São Paulo: Varela, 1996.182p.

ANITESCU, G.; DONEANU, C.; RADULESCU, V. Isolation of coriander oil: comparison between steam distillation and supercritical CO2 Extraction. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 12, p.173-176, 1997. Disponível em: <[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/\(ISSN\)1099-1026](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)1099-1026)>. Acesso em: 25 mar. 2014.

ARAÚJO, C. D.; CARVALHO, H. H. C.; SOUTO, S. de A.; SOBREIRO, A. A.; WIEST, J. M. Atividade antibacteriana *in vitro* de extratos de alho nirá (*Allium*



*tuberosum* - Rottler ex Sprengl), sobre agentes de interesse em alimentos. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.11, p.263 - 268, 2009.

AVANCINI, C. A. M.; WIEST, J. M. Atividade desinfetante do decocto de *Hypericum caprifoliatum* Cham. Schlecht. *Hypericaceae* (Guttiferae) (“escadinha” /” sinapismo”) frente a diferentes doses infectantes de *Staphylococcus aureus* (agente infeccioso em mastite bovina). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.10, n.1, p.64-69, 2008.

AVANCINI, C. A. M.; WIEST, J. M.; IRGANG, B. E.; ALMEIDA, J. P.; MUNDSTOCK, E. C. Atividade antibacteriana *in vitro* do decocto de *Hypericum caprifoliatum* Cham. Schlecht. *Hypericaceae* (Guttiferae) – “escadinha” /” sinapismo” – sobre bactérias de interesse em ambientes na área de medicina veterinária. **Ars Veterinária**. v. 18, n. 3, p. 300 – 306, 2002.

BAILEY L H. **Manual of Cultivated Plants: Most Commonly Grown in the Continental United States and Canada**. Editora Macmillan Publ., 1977. 1116 p.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, n. 2, p. 446-475, 2008. Disponível em: <[http://www196.44.109.146/Gaston/Back%20up%20LacVie/Back%20up%20ifolder%20Gaston%2008122010/Alfred/Research/Literature\\_papers/articles\\_essentials\\_oils/Bakkali%20Effects%20of%20essential%20oils.pdf](http://www196.44.109.146/Gaston/Back%20up%20LacVie/Back%20up%20ifolder%20Gaston%2008122010/Alfred/Research/Literature_papers/articles_essentials_oils/Bakkali%20Effects%20of%20essential%20oils.pdf)>. Acesso em: 10 mar. 2014.

BARROS, C. J.; CONCEIÇÃO, L. M.; NETO, G. N. J.; COSTA, V. A. C.; SIQUEIRA, J. P.; BASÍLIO JR., I. D.; SOUZA, E.L. Interference of *Origanum vulgare* L. essential oil on the growth and some physiological characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. **LWT - Food Science and Technology**, v.42, n. 6, p. 409 - 413, 2009. Disponível em :< <http://www.journals.elsevier.com/food-control>>. Acesso em: 24 mar. 2014.

BARTZ, S. **Contaminação microbiológica e avaliação de métodos de higienização de panos de limpeza utilizados em serviços de alimentação**. 2008.79f. Dissertação (mestrado em Ciências do Alimento) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

BENLI, M.; KAYA, I.; YIGIT, N. Screening antimicrobial activity of various extracts of *Artemisia dracunculoides* L. **Cell Biochemistry and Function**, v. 25, p.681-186, 2007. Disponível em:<<http://www.interscience.wiley.com>>. acesso em 20 fev. 2014.

BONITA, R.; BEAGLEHOLE, R.; KJELLSTRÖM, T. **Epidemiologia Básica**. 2 ed. Santos São Paulo: Editora Santos, 2011. 213p.

BONYADIAN, M; MOSHTAGHI, H. BACTERIOCIDAL activity of some plants essential oils against *Bacillus cereus*, *Salmonella Typhimurium*, *Listeria monocitogenes* and *Yersinia enterocolitica*. **Reserch Journal of Microbiology**, v. 3, p. 648-653, 2008. Disponível em: <http://interesjournal.org/IRJM/Pdf/2008/March/Uboh%20et%20al.pdf>. Acesso em 05 mar. 2014.

BOROWSKY, L.M.; SCHMIDT, V.; CARDOSO, M. Estimation of most probable number of *Salmonella* in minced pork samples. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p 544-546, 2007.

BOZOGLU, F.; ALPAS, H.; KALETUNC, G. Injury recovery of foodborne pathogens in high hydrostatic pressure treated milk during storage. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v.40, n. 3, p. 243-247, 2004. Disponível em: <<http://www-periodicos-capes-gov-br.ez45.periodicos.capes.gov.br>>. Acesso em: 10 mar. 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Farmacopeia Brasileira** V.1, 5. Ed., p. 545, 2010. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd\\_farmacopeia/index.htm](http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/index.htm)>. Acesso em 12 jan. 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **RDC Nº 12, de 2 de janeiro de 2001**. Disponível em: <[http://www.portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RDC\\_12\\_2001.pdf?MOD=AJPERES](http://www.portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RDC_12_2001.pdf?MOD=AJPERES)>. Acesso em 03 abr. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Portaria Nº 5, de 08 de novembro de 1988**. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=6496>>. Acesso em 16 dez. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa Nº 62, de 26 de agosto de 2003**. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2851>>. Acesso em: 12 out. 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA)**. Aprovado pelo Decreto no. 30.691, 29/03/52, alterado pelos Decretos no 1255 de 25/06/62, 1236 de 02/09/94, 1812 de 08/02/96 e 2244 de 04/06/97. Brasília, 1952. 241p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. **Análise Epidemiológica dos Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. Atualizado em 08 ago. 2008**. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/DTA.pdf>>. Acesso em: 10 de mar. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004**. Disponível em:< <http://www.anvisa.gov.br> >. Acesso em: 04 de maio de 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos**. Série A. Normas e manuais técnicos. Editora Ms Brasília – DF, 2010. 158p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos, 2013**. Disponível em: <<http://www.camara.leg.br/atividade-legislativa/...2013/.../view>>. Acesso em: 13 de dezembro de 2013.

BRITISH STANDARDS INSTITUTION. **European Standard EM 1040:2005**. Chemical disinfectants and antiseptics – quantitative – suspension test for the evaluation

of basic bacterial activity of chemical disinfectants and antiseptics: test method and requirements (phase 1) London, 2006.

BRONER, S.; TORNER, N.; DOMINGUEZ, A.; MARTÍNEZ, A.; GODOY, P. Sociodemographic inequalities and outbreaks of foodborne diseases. **Food Control**, v.21, p. 947-951, 2010. Disponível em: <[www.elsevier.com/locate/foodcont](http://www.elsevier.com/locate/foodcont)>. Acesso em: 5 mar. 2014.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, n.3, p.223-253, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/periodicos/capes.gov.br/science/journal/01681605>>. Acesso em 24 mar. 2014.

CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C. Salmonela na segurança dos alimentos. **Biológico**, v.70, n.1, p.11-13, 2008. Disponível em: <[http://www.biologico.sp.gov.br/docs/bio/v70\\_1/cardoso.pdf](http://www.biologico.sp.gov.br/docs/bio/v70_1/cardoso.pdf)>. Acesso em: 30 mar. 2014.

CARVALHO, H. H. C.; CRUZ, F. T.; WIEST, J. M. Atividade antibacteriana em plantas com indicativo etnográfico condimentar em Porto Alegre, RS/Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.7, p. 25-32, 2005.

CARVALHO, H. H. C.; WIEST, J. M.; GRECO, D. P. Atividade antibacteriana e a preditividade do condimento *Artemisia dracunculus* Linn. (*Asteraceae*), variedade inodora – estragão – frente a *Salmonella* sp. **Revista Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1., p. 75-79, 2006.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos **in Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Organizadores SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Editora UFRGS. Porto Alegre RS, editora UFSC Florianópolis SC. 2007. 1102p.

CASTAGNA, S. M. F.; SCHWARZ, C. W.; CANAL, C. W. Presença de *Salmonella* sp. no trato intestinal e em tonsilas/linfonodos submandibulares de suínos ao abate. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, p. 300-306, 2004.

CAVALLI-SFORZA, L. **Biometrie**. Grundzüge biologisch-medizinischer Statistik. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag. 1974. p.201-204.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC) - 2000. Surveillance for foodborne-disease outbreaks – United States, Appendix B – **Guidelines for confirmation of foodborne-disease outbreaks**. *CDC Surveillance Summaries*, MMWK, 49(SS-1): 54-62 Disponível em: <[http://www.dhss.mo.gov/CDManual/Foodborne\\_condensed.pdf](http://www.dhss.mo.gov/CDManual/Foodborne_condensed.pdf)> Acessado em: 01 outubro de 2013.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2011. **CDC Estimates of Foodborne Illness in the United States**: CDC has estimates for two major groups of foodborne illnesses. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/foodborneburden/2011-foodborne-estimates.html>>. Acesso em: 21 fev. 2014.

CORDEIRO, T. S.; PILETTI, R. **Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de Alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e Sálvia (*Salvia officinalis*) para aplicação em alimentos**. 2013. 13f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de

tecnologia de alimentos) – Universidade do Extremo Sul Catarinense, SC, 2013. Disponível em: <http://www.repositorio.unesc.net/bitstream/handle/1/1809/Tamires%20Silveira%20Cordeiro.pdf?sequence=1>. Acesso em 10 mar. 2014.

CORRÊA, R. M.; PINTO, J. E. B. P.; REIS, E. S.; COSTA, L. C. B.; ALVES, P. B.; NICULAN, E. S.; BRANT, R. S. Adubação orgânica na produção de biomassa de plantas, teor e qualidade de óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) em cultivo protegido. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.12, n.1, p.80-89, 2010.

CÔRTEZ, J. de A. **Epidemiologia: conceitos e princípios fundamentais**. São Paulo: Varela. 1993. 227p.

COSTALUNGA, S.; TONDO, E. C. **Salmonellosis in Rio Grande do Sul, Brazil, 1997 to 1999**. **Braz. J. Microbiol**, v.33, n.4, p. 342-346, 2002. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=1517-8382&script=sci\\_serial](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=1517-8382&script=sci_serial)>. Acesso 18 fev. 2014.

COUTO M. E. O. **Coleção de plantas medicinais aromáticas e condimentares**. Documento 157. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, p. 91, 2006 Disponível em: <<http://www.cpact.embrapa.br/publicacoes/documentos/documento-157.pdf>>. Acesso em: 15 de fev. 2014.

CUNHA, A.P. **Aspectos históricos sobre plantas medicinais, seus constituintes ativos e fitoterapia**. 2003. Disponível em: <[http://www.esalq.usp.br/siesalq/pm/aspectos\\_historicos.pdf](http://www.esalq.usp.br/siesalq/pm/aspectos_historicos.pdf)>. Acesso em 10 nov.2013.

CUNHA, B. **Investigação de surtos alimentares ocorridos em serviços de alimentação no Rio grande do Sul**. 2008. 45f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação) Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.

CZAMANSKI, R.T. **Prospecção de atividade Antibacteriana em resíduos de viticultura na perspectiva da desinfecção em antissepsia aplicada à saúde e à produção animal, bem como à agroindústria Familiar**. 2013. 191 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinária) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, 2013.

CHALESHTORI, R. S.; ROKNI, N.; RAZAVILAR, V.; KOPAEI, R. M. The Evaluation of the Antibacterial and Antioxidant Activity of Tarragon (*Artemisia dracunculus* L.) Essential Oil and Its Chemical Composition. **Jundishapur Journal Microbiol**, v. 6, n. 9, p. 1 - 5, 2013. Disponível em: <[http://jjmicrobiol.com/?page=pages&page\\_id=137](http://jjmicrobiol.com/?page=pages&page_id=137)>. Acesso em: 15 mar. 2014.

DADALIOĞYLU, I.; EVRENDILEK, G. A. Chemical Compositions and Antibacterial Effects of Essential Oils of Turkish Oregano (*Origanum minutiflorum*), Bay Laurel (*Laurus nobilis*), Spanish Lavender (*Lavandula stoechas* L.), and Fennel (*Foeniculum vulgare*) on Common Foodborne Pathogens. **J. Agric. Food Chem**, v. 52, p. 8255-8260, 2004. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/journal/jafcau>>. Acesso em: 15 fev. 2014.

D'AOUST, J. Y.; PIVNICK, H. Letter: Small infectious doses of *Salmonella*. **The Lancet**, v.1. p. 866, 1976.

DAWSON, A. G. **O poder das ervas: um guia sobre o uso medicinal, culinário**. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s11418-011-0579-x>>. Acesso em: 20 mar. 2014.

Divisão de Vigilância Epidemiológica - Centro Estadual de Vigilância em Saúde-Secretaria Estadual de Saúde/RS, 2012.

DVG (Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft/ Sociedade Alemã de Medicina Veterinária). **Richtlinien zur Prüfung chemischer Desinfektionsmittel für die Veterinärmedizin/ Normas para a testagem de desinfetantes químicos destinados à medicina veterinária**. Giessen, 1980. In: SCHLIESSER, Th.; STRAUCH, D. **Desinfektion in der Tierhaltung, Fleisch- und Milchwirtschaft**. Stuttgart: Enke Verlag, 1981. 455p.

estratégia de la OMS sobre medicina tradicional disponível em :<http://www.dominiopublico.gov.br/download/texto/op000023.pdf> acessado em 03 de fev de 2014.

EUROPEAN UNION: European Food Safety Authority (EFSA) e European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. **EFSA Journal**, v. 12, n. 2, p. 312, 2014. Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2597.pdf>>. Acesso em: 10 fev. 2014.

FALLER, A.L. K.; FIALHO, E. Disponibilidade de polifenóis em frutas e hortaliças consumidas no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v.43, n.2, p. 211-218, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rsp/v43n2/207.pdf>>. Acesso em: 15 out 2013.

**FARMACOPEIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL**. 2. ed. São Paulo. Indústria Gráfica Siqueira. 1959. P. 331-391.

FERNANDEZ, M. P. S., TRONCOSO, A. M.; GARCIA-PARRILHA. Antioxidante activity of phenolic compounds: from in vitro to in vivo evidence. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, p. 649-671, 2008. Disponível em: < <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408390701761845#Uw-A0fldWJE>>. Acesso em: 24 fev. 2014.

FIGUEIREDO, J.E.S.; **Análise de conteúdo do desencadeamento e preparação alimentar em surtos toxinfetivos alimentares no Rio Grande do Sul /Brasil 2001 a 2010**. 2013. 57f. Dissertação (Ciências do Alimento) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

FILHO, D. W.; SILVA, E. L.; BOVERIS, A. **Flavonóides antioxidantes de plantas medicinais e alimentos: Importância e perspectiva terapêuticas em Plantas medicinais: sob a ótica da química moderna**. Chapecó, Santa Catarina: editora Argos, 2001. 523p.

FORNARI, T.; VICENTE, G.; VÁZQUEZ, E.; GARCÍA-RISCO, M. R.; REGLERO, G. Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid extraction. **Journal of Chromatography**, v. 1250, p.34-48, 2012. Disponível em:<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967312006437>>. Acesso em: 30 mar. 2014.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2. ed. Porto Alegre. Artmed. 2010. p. 607.

FURLAN, M. R. **Dossiê Técnico Cultivo de Plantas Condimentares Herbáceas**. Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais / CETEC, 2007. 29p

GEIMBA, M. P., TONDO, E. C., OLIVEIRA, F. A., CANAL, C. W.; BRANDELLI, A. Serological characterization and prevalence of *spvR* genes in *Salmonella* isolated from foods involved in outbreaks in **Brazil**. **J. Food Prot.**, v.67, n. 1229–1233, 2004. Disponível em: <<http://www.foodprotection.org/publications/journal-of-food-protection>>. Acesso em 25 mai. 2013.

GIROLOMETTO, G. **Relação entre salmonelas isoladas de alimentos e extratos de plantas condimentares, na perspectiva de atividade antibacteriana e preditividade diagnóstica**. 2014. 113f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2014.

GIROLOMETTO, G.; AVANCINI, C. A. M.; CARVALHO, H. H. C.; WIEST, J. M. Atividade antibacteriana de extratos de erva mate (*Ilex paraguariensis* A St.Hil.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, p.49 - 56, 2009.

GREIG, J.D.; RAVEL A. Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution. **International Journal of Food Microbiology**, v. 130, n. 2, p. 77-87, 2009. Disponível em:<<http://ac.els-cdn.com.ez45.periodicos.capes.gov.br/S0168160508006855/1-s2.0>>. Acesso em: 30 set. 2013.

GRIMONT, P.A. D.; GRIMONT, F.; BOUVET, P. Taxonomy of the genus *Salmonella*. In: WRAY, C.; WRAY, A. **Salmonella in Domestic Animals**, Oxfordshire: Cabi Publishing, p 1-17, 2000.

GUIBOURDENCHE, M.; ROGGENTIN P.; MIKOLEIT, M.; FIELDS, P. I.; BOCKEMUHL, J.; GRIMONT, P.A.D.; Weill, F.X. Supplement 2003e2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-LeMinor scheme. **Research in Microbiology, Paris, FR**, v.161, p 26-29, 2010. Disponível em <<http://www.elsevier.com/locate/resmic>>. Acesso em: 12 dez. 2013.

GUNDUZ G.T.; GONUL S.A.; KARAPINAR M. Efficacy of oregano oil in the inactivation of *Salmonella typhimurium* on lettuce. **Food Control**, v. 21, p. 513–517, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect-com.ez45.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0956713509002308>>. Acesso em:10 mar. 2014.

GUTIERREZ, J.; C. BARRY-RYAN, P. BOURKE. Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid extraction. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223–253, 2004. Disponível em :<<http://www.journals.elsevier.com/international-journal-of-food-microbiology/>>. Acesso 25 mar. 2014.

HARDY, K.; BUCKLEY, S.; COLLINS, M. J.; ESTALRRICH, A.; BROTHWELL, D.; COPELAND, L.; GARCÍA-TABERNERO, A.; GARCÍA-VARGAS, S.; DE LA RASILLA, M.; FOX, C. L.; HUGUET, R.; BASTIR, M.; SANTAMARÍA, D.; MADELLA M.; WILSON, J.; CORTÉS, Á F.; ROSAS, A. Neanderthal medics? Evidence for food, cooking, and medicinal plants entrapped in dental calculus. Springer-Verlag. **Naturwissenschaften**, v.99, p. 617–626, 2012. Disponível em: <http://www.springer.com/life+sciences/journal/114>>. Acesso em 12 mar. 2014.

HETZEL DE LA C. L. PEREZ; SANCHEZ, G. M. La Bixa orellana L. en el tratamiento de afecciones estomatológicas, un tema aún por estudiar The Bixa orellana L. in treatment of stomatology affections: a subject that hasn't studied yet. **Revista Cubana de Farmacia**, v.44, n.2, p.231, 2010. Disponível em: <[http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=0034-7515&script=sci\\_serial](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=0034-7515&script=sci_serial)>. Acesso em: 10 mar. 2014.

HUMPHREY T. *Salmonella*, stress responses and food safety. **Nature Reviews Microbiology**. v.2, n. 6, p. 504-509, 2004.

HUMPHREY T; JORGENSEN, F. Pathogens on meat and infection in animals - Establishing a relationship using *Campylobacter* and *Salmonella* as examples. **Meat Science**, v. 74, n. 1, p. 89-97, 2006. Disponível em: <<http://www.journals.elsevier.com/meat-science>>. Acesso 14 fev. 2014.

IFTODA, E. M. **Interdisciplinaridade e transdisciplinaridade**. Um convite à visão holística. Cadernos de Direito, Vol. 1, n.º 1. São Paulo: Unimep, 2001.

IRKIN, R.; ABAY, S.; AYDIN; F. Inhibitory Effects of Some Plant Essential Oils Against *Arcobacter butzleri* and Potential for Rosemary Oil as a Natural Food Preservative. **JOURNAL OF MEDICINAL FOOD**, v. 14 n. 3, p. 291–296, 2011. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com.ez45.periodicos.capes.gov.br/doi/pdf/10.1089/jmf.2010>>. Acesso em 15 mar. 2014.

JAY, J.M.; LOESSNER, M.J.; GOLDEM, D.A. **Modern food microbiology**. Springer, New York, NY, p. 229-233.

Jay, M. J. **Microbiologia dos Alimentos**, Porto Alegre: Artmed, 6 edição. 2005. 711p.

JOHNSON, C.B.; KAZANTZIS, A.; SKOULA, M.; MITTEREGGER, U.; NOVAK, J. Seasonal, populational and ontogenic variation in the volatile oil content and composition of individuals of *Origanum vulgare* subsp. Hirtum, assessed by GC headspace analysis and by SPME sampling of individual oil glands. **Phytochem. Anal.**, n.15, p. 286–292, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1531843>>. Aceso em: 21 mar. 2014.

KÄFERSTEIN, F. K.; MOTARJEMI Y.; BETTCHER, D. W. Foodborne disease control: A transnational challenge. **Emerging Infectious Diseases**, v.3, n. 4, p. 503-510, 1997. Disponível em: <<http://wwwnc.cdc.gov/eid/>>. Acesso em 15 mar. 2014.

KAROU, D.; DICKO M. H.; SIMPORE, J.; TRAORE A. S. Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedicinal plantas of Burkina Faso. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 8, p. 823 – 828, 2005.

KAVADIAS, D.; ABOU-MANDOUR, A.A.; CZYGAN, F.; BECKMANN, H.; SAND, P.; RIEDERER, P.; SCHREIER, P. Identification of Benzodiazepines in *Artemisia dracuncululus* and *Solanum tuberosum* Rationalizing Their Endogenous Formation in Plant Tissue. **Biochemical and Biophysical Research**. V.269, p. 290–295, 2000. Disponível em: <<http://www.idealibrary.com>>. Acesso em 08 out. 2013.

KIM, H.; BHUNIA, A. K. SEL, a Selective Enrichment Broth for Simultaneous Growth of *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogene*. **Applied**

and **Environmental Microbiology**, v.74, n. 15, p. 4853–4866, 2008. Disponível em: <<http://www.aem.asm.org/content/74/15/4853>>. Acesso em: 23 jan. 2014.

KINTZIOS, S.E. **Oregano: the Genera *Origanum* and *Lippia***. Ed. Taylor e Francis Group. 2004.

KOKKINI, S; KAROUSOU,R., LANARAS, T essential oils of spearmint (carvone-rich) plants from the Island of Crete (Greece) **Biochemical Systematics And Ecology**, , v.23, n.4, p.425-430 1995.

KORDALI, S.; KOTAN, R.; MAVI, A; ÇAKIR, A.; ALA, A.; YILDIRIM, A. Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *Artemisia dracunculus*, *Artemisia santonicum*, and *Artemisia spicigera* essential oils. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.53, n.24, p. 9452-8, 2005. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/journal/jafcau>>. Acesso em 25 mar. 2014.

KOTTWITZ L. B. M.; OLIVEIRA, T.C.R.M.; ALCOCER, I.; FARAH, S. M. S. S.; ABRAHÃO, W. S. M.; RODRIGUES, D. P. Avaliação epidemiológica de surtos de salmonelose ocorridos no período de 1999 a 2008 no estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientia**. 2010. 32:9-15. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_nlinks&ref=000077&pid=S1517-8382201300010000500011&lng=es](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000077&pid=S1517-8382201300010000500011&lng=es)>. Acesso em: 10 de fevereiro de 2014.

LAVINIKI, V. **Atividade antibacteriana in vitro dos óleos essenciais de canela da china (*Cinnamomum cassia*), orégano (*Origanum vulgare*), pimenta negra (*Piper nigrum*) e tomilho branco (*Thymus vulgaris*) frente à amostras de *Salmonella enterica* isoladas de aves. 2013. 51f.** Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2013. Disponível em <<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/75654/000891722.pdf?sequence=1>> . Acesso em: 19 out. 2013.

LEQUIEN V. Les toxi-infections alimentaires collectives en 2008 **Actualités pharmaceutiques hospitalières** R n° 21 R Février 2010. Disponível em: <http://www.sciencedirect-om.ez45.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S1769734410702201>. Acesso em 22 fev. 2014.

LIVERMORE, D.M., Introduction: the challenge of multiresistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.29, n.3, p. S1-S7, 2007.

LOGENDRA, S. D. M.; RIBNICKY, H.; YANG, A.; POULEV, J.; MA, E. J.; KENNELLY, I. Bioassay-guided isolation of aldose reductase inhibitors from *Artemisia dracunculus*. **Phytochemistry**, v. 67, p.1539–1546, 2006. Disponível em: <<http://www.elsevier.com/locate/phytochem>>. Acesso em 19 de mai. 2013.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil**. Nova Odessa, Instituto Plantarum de Estudos da Flora. 630p. 2000.

MACIEL, M. J.; PAIM, M. P.; CARVALHO, H. H. C.; WIEST, J. M. Avaliação do extrato alcoólico de hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.) como fator de proteção antibacteriana e antioxidante. **Rev Instituto Adolfo Lutz**. v.71, n. 3, p.462-470, 2012.



MACHADO, R. T. Sinais de qualidade e rastreabilidade de alimentos: uma visão sistêmica. **Organizações Rurais & Agroindustriais**, v. 7, n. 2, p. 227-237, 2005

MANACH, C.; WILLIAMSON, G.; MORAND, C.; SCALBERT, A.; RÉMÉSY C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies 1–3. **American Journal Of Clinical Nutrition**, v.81 n. 1, p.230 - 242, 2005. Disponível em:< <http://ajcn.nutrition.org.ez45periodicos.capes.gov.br/content/81/1/230.S.full.pdf+html>>. Acesso em: 12 de fevereiro de 2014.

MARTINO, L.; FEO, V.; FORMISANO, C.; MIGNOLA, E.; SENATORE, F. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Origanum vulgare ssp. hirtum* (Link) Ietswaart growing wild in Campania (South Italy). **Molecules**, v. 14, p. 2735 – 2746, 2009. Disponível em : <<http://ebookbrowse.net/gc-ms-origanum-vulgare-2009-01-pdf-d586082023>>. Acesso em 25 mar. 2014.

MAU, J. L.; CHEN, C.; HSIEH, P. Antimicrobial effect of extracts from Chinese chive, cinnamon, and conifera fructus. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v.49, n.1, p.183-188, 2001. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf000263c?prevSearch=%255B>>. Acesso em 12 nov. 2011.

MERUSSI, G. D.; MAFFEI, D. F.; CATANOZI M. P. L. M. Outbreaks of gastroenteritis related to dairy products intake in the state of Sao Paulo from 2000 to 2010. **Alimento e Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 639-645, 2012. Disponível em: <<http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/alimentos>>. Acesso em: 02 mar. 2014.

MING, L. C. Coleta de Plantas Mediciniais. In: DI STASI, L.C. **Plantas medicinais arte e ciência: um guia de estudo interdisciplinar**. UNESP. São Paulo, 1996. p. 69-86.

MORAES-DE-SOUZA, R.A. **Potencial antioxidante e composição fenólica de infusos de ervas consumidas no Brasil**. 2007. 59f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade, Piracicaba, São Paulo, 2007.

MORAIS M.S.; CAVALCANTI, E. S. B.; COSTA S.M.O.; AGUIAR, L. A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19 n.1B, p. 315-320, 2009. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v19n1b/a23v191b.pdf> >. Acesso em: 25 de fev. 2014.

MÜRMAN, L.; SANTOS, M. C DOS; LONGARAY, S. M.; BOTH, J. M. C.; CARDOSO, M. Quantification and molecular characterization of *Salmonella* isolated from food samples involved in salmonellosis outbreaks in Rio Grande do Sul, Brazil. **Brasilian Journal of Microbiology** v. 39, p. 529-534, 2008. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1517-3822008000300024&script=sci\\_arttext&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1517-3822008000300024&script=sci_arttext&tlng=pt)>. Acessado em: 22 dez. 2013.

MURTHY, P. S.; NAIDU, M. M. Sustainable management of coffee industry by-products and value addition: A review. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 66, p. 45, 2012. Disponível em: < <http://www.journals.elsevier.com/resources-conservation-and-recycling>>. Acesso em: 25 mar. 2014.

NORMAN, J. **Ervas e especiarias: origens, sabores, cultivos e receitas**. São Paulo. Publifolha. 336p. 2012.

OLIVEIRA, C. E. V. DE; STAMFORD, T. L. M; GOMES NETO N. J., SOUZA E. L. Inhibition of *Staphylococcus aureus* in broth and meat broth using synergies of phenolics and organic acids. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, p. 312-316, 2010. Disponível em: <[www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro](http://www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro)>. Acesso em: 12 fev. 2014.

OLIVEIRA, T. L. C.; SOARES, R. A.; PICCOLI, R. H. A Weibull model to describe antimicrobial kinetics of oregano and lemongrass essential oils against *Salmonella* Enteritidis in ground beef during refrigerated storage. **Meat Science**, v. 93, n. 3, p.645-651, 2013. Disponível em: <<http://www.journals.elsevier.com/meat-science/>>. Acesso em 15 mar. 2014.

OPAS Organização Pan-Americana da Saúde. **Cooperação técnica entre países para formação de dirigentes de recursos humanos em saúde**. 2010. 80 p. Disponível em: <<http://www.paho.org/bra/pdf>>. Acesso em 12 jan. 2014.

OPAS Organización Panamericana De La Salud. La medicina Tradicional. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana.**, Washington, 108(1), p.77-80, 1990.

OPAS Organizacion Panamericana De La Salud. **Métodos de investigação epidemiológica em doenças transmissíveis**. Brasília [s.n. ].v.1, 1997.181p.

PINELA, J.; BARROS, L.; CARVALHO, A.M. FERREIRA, I.C.F.R. Influence of the drying method in the antioxidant potential and chemical composition of four shrubby flowering plants from the tribe Genisteae (Fabaceae). **Food and Chemical Toxicology**, v.49, p. 2983–2989, 2011. Disponível em: <<http://www.elsevier.com/locate/foodchemtox>>. Acesso em: 08 mar. 2014.

PINTO, A.T. **Investigação de enfermidades transmitidas por alimentos em Porto Alegre - RS**. 86f. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias) Porto Alegre: Faculdade de Veterinária da UFRGS. 1999.

PINTO, A.T.; BERGMANN, G. P. Investigação de enfermidades transmitidas por alimento. **Higiene Alimentar**, v. 14, n. 74, p. 21 – 24, 2002.

QUINN, T J.; MARKEY, B.; LEONARD, F. C.; FITZPATRICK E. S.; FANNING, S.; HARTIGAN, P. J. **Veterinary microbiology and Microbial Disease**. 2 ed. Iowa-Blackwell, 1232p. 2011. Disponível em: <<http://books.google.com.br/books>>. Acessado em: 06 jan. 2014.

RAEISI, M.; TAJIK, H.; RAZAVI ROOHANI, S. M.; MAHAM, M.; MORADI, M.; HAJIMOHAMMADI, B.; NAGHILI, H.; HASHEMI, M.; MEHDIZADEH, T. Essential oil of tarragon (*Artemisia dracunculoides*) antibacterial activity on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in culture media and Iranian white cheese. **Iranian Journal of Microbiology**. v. 4 n. 1, p. 30-33. 4, 2012. Disponível em: <<http://ijm.tums.ac.ir/index.php/ijm/article/view/384.pdf>>. Acesso em 15 mar. 2014.

RANTHUM, M.A. **Subnotificação e alta incidência de Doenças Veiculadas por Alimentos e de seus fatores de risco: causas e consequências no município de Ponta Grossa- PR**. 124f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Universidade Estadual de Ponta Grossa – PR. Disponível em: <<http://teses.icict.fiocruz.br/pdf/ranthummam.pdf>>. Acesso em: 15 mai. 2013.

RAY, B. Sublethal injury, bacteriocins, and food microbiology. **American Society Microbiology**, n.59, p. 285-291, 1993.

REYBROUCK, G. Efficacy of inactivators against 14 disinfectant substances. *Bakteriologie und Hygiene. Zentralblatt: Abt. Orig. B.*, Berlin, v. 68<sup>a</sup>, p. 480 – 492, 1979.

REYBROUCK, G. The testing of disinfectants. *International Biodeterioration & Biodegradation*. **Oxford**, v. 41, p. 269-272, 1998.

RIBNICKY, D. M., POULEV, A., O'NEAL, J., WNOROWSKI, G., MALEK, D. E., JÄGER, R.; RASKIN, I. Toxicological evaluation of the ethanolic extract of *Artemisia dracunculus* L. for use as a dietary supplement and in functional foods. **Food and Chemical Toxicology**, v.42, p.585-598, 2004. Disponível em: < Food and Chemical Toxicology>. Acesso em 30 de outubro de 2013.

SANTOS M.M.P; VIEIRA-DA-MOTTA, O; VIEIRA, I.J.C; BRAZ, R; GONCALVES, P.S; MARIA, EJ; TERRA, WS; RODRIGUES, R; SOUZA, C.L.M. Antibacterial activity of *Capsicum annuum* extract and synthetic capsaicinoid derivatives against *Streptococcus mutans*. **Journal Of Natural Medicines**, v.66, n, 2, p 354-356, 2012. Disponível em: < [http://www.medsci.cn/sci/show\\_paper.asp?id=8b392944878](http://www.medsci.cn/sci/show_paper.asp?id=8b392944878) >. Acesso em 10 mar. 2014.

SANTURIO, J. M.; SANTURIO, D. F.; MORAES, C. FRANCHIN, P. R.; ALVES, S. H. Atividade antibacteriana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37 p. 803-808, 2007.

SAYYA, M; NADJAFNIA, L; KAMALINEJAD, M. Anticonvulsant activity and chemical composition of *Artemisia dracunculus* L. essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.94, n.2-3, p.283-287, 2004.

SCHIEDECK, G. **Aproveitamento da biodiversidade regional de plantas bioativas para a sustentabilidade dos agricultores de base ecológica na região sul do RS**. Pelotas: EMBRAPA clima Temperado, 2006. 51f.

SHAHRIYARY, L.; YAZDANPARAST, R. Inhibition of blood platelet adhesion, aggregation and secretion by *Artemisia dracunculus* leaves extracts. **Journal of Ethnopharmacology**. v.114, p.194–198, 2007.

SILVA JUNIOR, E.A. Manual de controle higiênico-sanitário em serviços de alimentação. 6. ed. São Paulo: Varela, 2013.642p.

SILVA, V.; AMARAL, A. M. P.. A. Segurança alimentar, comércio internacional e segurança sanitária. **Informações Econômicas**, v. 34, n. 6, p. 38-45, 2004.

SILVEIRA, S. M. DA; CUNHA, A. JÚNIOR; SCHEUERMANN, G. N.; SECCHI, F. L.; VIEIRA, C. R. W. Composição química e atividade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas selecionadas cultivadas no Sul do Brasil contra micro-organismos patogênicos e deteriorantes de alimentos. **Ciência Rural**, v.42, n.7, p.1300-1306, 2012. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782012000700026](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782012000700026)>. Acesso em 14 mar. 2014.

SIMÕES C. M. O. Óleos voláteis IN: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Organizadores SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. 6. ed. Porto Alegre: Editora UFRGS, Florianópolis: editora UFSC. 2007. 1102 p.

SOUZA E. L. DE; STAMFORD, T. L. M.; LIMA, E. O.; BARBOSA, J. M. F.; MARQUES, M. O. M. Interference of heating on the antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum vulgare* L. (*Lamiaceae*) essential oil. **Food Control**, v. 18, p. 409–413, 2007.

SOUZA, A. A.; WIEST, J. M.; Atividade antibacteriana de *Aloysia gratissima* (Gill et Hook)Tronc. (garupá, erva-santa) usada na medicina tradicional no Rio Grande do Sul-Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.9, p.23 - 29, 2007.

SOUZA, E.L.; STAMFORD, T.L.M.; LIMA, E.D.O.; BARBOSA, J.M. ; MARQUES, M.O.M. Interference of heating on the antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum vulgare* L. (*Lamiaceae*) essential oil. **Ciência E Tecnologia De Alimentos**, v. 28, n. 2, p. 418-422, 2008. Disponível em: < <http://www.scielo.br/cgi-bin/wxis.exe/iah/>>. Acesso em 12 mar. 2014.

STALIKAS, C.D.; Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids (review); **Journal of Separation Science**, v. 30, p. 3268–3295, 2007. Disponível em: <[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/\(ISSN\)1615-9314](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)1615-9314)>. Acesso em: 24 fev. 2014.

STOBART, T. **Ervas, temperos e condimentos de A a Z**. ed. Rio de Janeiro: Jorge Zahar. 2009. 359 p.

SUNILSON, J. A. J; SURAJ, R.; REJITHA, G.; ANANDARAJAGOPAL, K.; KUMARI, A.V.A.G.; PROMWICHIT, P. In vitro antimicrobial evolution of *Zingiber officinale*, *Curcuma longa* and *Alpinia galanga* extracts in natural food preservatives. **American Journal of Food Technology**. v. 4, n. 5, p. 192 – 200, 2009. Disponível em: <[http://www.scialert.net/qredirect.php?doi=ajft.2009\\_192.200&linkid=pdf](http://www.scialert.net/qredirect.php?doi=ajft.2009_192.200&linkid=pdf)>. Acesso em 15 mar.2014.

SWANSTON-FLATT, S. K.; DAY, C.; BAILEY, C. J.; FLATT, P. R.; Evaluation of traditional plant treatments for diabetes: studies in streptozotocin diabetic mice. **Acta diabetologia latina**, v.26, n. 1 p. 51-55, 1989. Disponível em: <<http://link-springer-com.ez45.periodicos.capes.gov.br/article/10.1007/BF02581196>>. Acesso em: 19 mar. 2014.

TINDALL, B. J.; GRIMONT, P. A. D.; GARRITY, G. M.; EUZÉ, J. P. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 521–524, 2005. Disponível em: <<http://ijs.sgmjournals.org/>>. Acesso em 12 dez. 2013.

TORTORA, G. J.; FUNKE B.R.; CASE C.L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artemed, 2012. 934 p.

USA United States of America. Department of Agriculture. Natural Resources conservation service. **Fact Sheets & Plant Guides** Disponível em: <[http://plants.nrcs.usda.gov/plantguide/pdf/cs\\_ar4.pdf](http://plants.nrcs.usda.gov/plantguide/pdf/cs_ar4.pdf)>. Acesso em 25 mai. 2013.

VEIGA JUNIOR, V. F. PINTO A. C. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, 519-528, 2005. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422005000300026](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422005000300026)>. Acesso em: 12 mar. 2014.

VINSON J. A. SU, X.; ZUBIK, L.; BOSE, P. Phenol antioxidant quantity and quality in foods fruits. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5315- 21, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11714322>>. Acesso em 15 out 2013.

VIUDA-MARTOS, M.; RUIZ-NAVAJAS, Y.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J.A. Antibacterial activity of different essential oils obtained from spices widely used in Mediterranean diet. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, n. 3, p 526-531, 2008. Disponível em: <[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1365-2621/issues](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1365-2621/issues)>. Acesso em: 20 mar. 2014.

WANG, M.; LINCOLN. E.; Effect of light intensity and artificial wounding on monoterpene production in *Myrica cerifera* from two different ecological habitats. **Can. J. Bot.**, v. 82, p. 1501–1508, 2004. Disponível em: <<http://www.nrcresearchpress.com/loi/cjb>>. Acesso em: 15 mar. 2014.

WHEELER J. G; SETHI, D.; COWDEN, J. M.; WALL, P. G.; RODRIGUES, L. C. Study of infectious intestinal disease in England: rates in the community, presenting to general practice, and reported to national surveillance. **British Medical Journal**, v. 318, p. 1046-1050, 1999. Disponível em: <<http://www.bmj.com/>>. Acesso em 27 mar. 2014.

WHO (World Health Organization). **Foodborne Disease Surveillance; Burden of foodborne diseases 2013**. Disponível em: <[http://www.who.int/foodsafety/foodborne\\_disease/ferg/en/index6.html](http://www.who.int/foodsafety/foodborne_disease/ferg/en/index6.html)>. Acesso em: 22 fev. 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Procedimientos para la investigación de brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos**. 2<sup>nd</sup> ed. Washington, OPAS/OMS, 127p. 1967.

WU, V. C. H. A review of microbial injury and recovery methods in food. **Food Microbiology**, v. 25 p. 735- 744, 2008. Disponível em: <[www.elsevier.com/locate/fm](http://www.elsevier.com/locate/fm)>. Acesso em 15 nov. 2013.

WU, V. C. H.; FUNG, D. Y. C. Simultaneous recovery and detection of four heat-injured foodborne pathogens in ground beef and milk by a four-compartment thin agar layer plate. **Journal of Food Safety**. v. 26, p. 126–136, 2006. Disponível em: <[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1745-4565](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1745-4565)>. Acesso em: 15 mar.2014.

WU, V. C. H.; FUNG, D. Y. C.; KANG, D. H.; THOMPSON, L. K.; Evaluation of thin agar layer method for recovery of acid-injured foodborne pathogens. **Journal. Food Protein**, n. 64, p. 1067–1071, 2001.

## Apêndice: A

Tabela: Intensidade da Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia (IINIB) Intensidade da atividade de Inativação bacteriana/bacteriocida (IINAB) de extratos etanólicos e hidroetanólico de *Artemisia dracunculus* e *Origanum vulgare* em diferentes concentrações frente a 9 *Salmonella enterica* em diferentes tempos de leitura.

<i>Salmonella</i>		Extrato Etanólico								Extrato hidroetanólico								
		<i>Artemisia dracunculus</i>				<i>Origanum vulgare</i>				<i>Artemisia dracunculus</i>				<i>Origanum vulgare</i>				
<i>enterica</i>	Horas		25%	20%	15%	10%	25%	20%	15%	10%	25%	20%	15%	10%	25%	20%	15%	10%
Infantis (surto 1)	24	IINIB	9	7	7	1	9	5,3	5,3	1	9	6	6,3	1	8	4	4	1
		IINAB	9	3,6	2,3	1	7,7	4,7	3,7	1	8,7	4	3	1	5,3	4	2	1
	48	IINIB	9	9	8,7	1	9	7,3	8,3	1	9	9	7	1	9	5,3	5	1
		IINAB	9	8	5	1	8,3	6,3	4,7	1	9	5,7	3,3	1	8,3	5	5	1
	72	IINIB	9	9	9	1	9	8,3	9	1	9	9	8	1	9	7,3	6	1
		IINAB	9	9	7,7	1	9	8,3	5,3	1	9	8	5	1	9	7	5	1
	144	IINIB	9	9	9	1	9	9	9	1	9	9	9	1	9	9	9	1
		IINAB	9	9	9	1	9	9	9	1	9	9	8,3	1	9	9	9	1
Enteritidis (surto 2)	24	IINIB	9	7,7	8,7	1	8,3	5	7,7	1	9	8,7	6,3	1	7	6	4	1
		IINAB	9	4	3	1	8	4,7	3,7	1	8,7	4	4	1	6	6	3,7	1
	48	IINIB	9	9	9	1	9	6	8	1	9	9	7	1	8,3	7	6	1
		IINAB	9	7,7	6,8	1	9	5,7	5	1	9	6	5,7	1	7,3	6,3	4	1
	72	IINIB	9	9	9	1	9	8,3	8	1	9	9	9	1	9	9	8	1
		IINAB	9	9	8	1	9	8,3	6	1	9	8	6,7	1	9	7	5	1
	144	IINIB	9	9	9	1	9	9	9	1	9	9	9	1	9	9	9	1
		IINAB	9	9	9	1	9	9	9	1	9	9	9	1	9	9	9	1
Enteritidis (surto 3)	24	IINIB	9	5,7	6	1	9	6	7	1	9	9	6	1	7,7	6	3	1
		IINAB	9	4	4	1	7	5,3	4	1	9	4,7	4	1	6	5,3	3	1
	48	IINIB	9	9	9	1	9	7,3	7	1	9	9	8	1	8	7,3	4	1
		IINAB	9	7,7	6	1	9	6	4	1	9	6	5	1	8	5,3	3	1
	72	IINIB	9	9	9	1	9	8,7	7,3	1	9	9	9	1	8,3	7,3	8	1
		IINAB	9	8,7	7	1	9	8,3	5,3	1	9	8	6	1	8,3	8	6	1
	144	IINIB	9	9	9	1	9	9	9	1	9	9	9	1	9	5,3	9	1
		IINAB	9	9	7,7	1	9	9	8,3	1	9	9	8,3	1	9	9	9	1

Tabela (cont.): Intensidade da Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia (IINIB) Intensidade da atividade de Inativação bacteriana/bacteriocida (IINAB) de extratos etanólicos e hidroetanólicos de *Artemisia dracunculus* e *Origanum vulgare* em diferentes concentrações frente a 9 *Salmonellas entéricas* em diferentes tempos de leitura.

<i>Salmonella</i>		Extrato Etanólico								Extrato hidroetanólico								
<i>enterica</i>		<i>Artemisia dracunculus</i>				<i>Origanum vulgare</i>				<i>Artemisia dracunculus</i>				<i>Origanum vulgare</i>				
	Horas	25%	20%	15%	10%	25%	20%	15%	10%	25%	20%	15%	10%	25%	20%	15%	10%	
Enteritidis (surto 4)	24	IINIB	9	5,6	7	1	9	7,3	7	1	9	9	5,7	1	8,3	5	4	1
		IINAB	9	4	2	1	7,7	6	3	1	9	5	4	1	6	4	3	1
	48	IINIB	9	8,7	9	1	9	7,7	7	1	9	9	8	1	8	5	6	1
		IINAB	9	6,7	3,7	1	9	6,7	3	1	9	7	5	1	8	5	4	1
	72	IINIB	9	9	9	1	9	8,7	7,3	1	9	9	8,7	1	8,7	8	8	1
		IINAB	9	8,7	7	1	9	8	5,3	1	9	8	5,7	1	8,3	6,3	5	1
	144	IINIB	9	9	9	1	9	9	9	1	9	9	9	1	9	9	9	1
		IINAB	9	9	8	1	9	9	8	1	9	9	9	1	9	9	9	1
Enteritidis (surto 5)	24	IINIB	9	8,7	7,7	1	8,7	7	5	1	9	8	6,3	1	6,3	5,7	4,7	1
		IINAB	9	7,7	4,3	1	7,7	6	3	1	9	5	4	1	6	5,7	4,7	1
	48	IINIB	9	9	8,7	1	9	7,3	7	1	9	9	8	1	8	6,7	6	1
		IINAB	9	8	4,7	1	8,7	7	4,3	1	9	6	5	1	6,3	5,7	5	1
	72	IINIB	9	9	9	1	9	8,7	8	1	9	9	8,7	1	9	8	6	1
		IINAB	9	9	7	1	9	8,7	6	1	9	7	5	1	9	6,7	5	1
	144	IINIB	9	9	9	1	9	9	9	1	9	9	9	1	9	9	9	1
		IINAB	9	9	8	1	9	9	9	1	9	9	7,7	1	9	9	9	1
Derby (surto 6)	24	IINIB	9	6,7	7	1	8	5,3	5	1	9	9	6	1	8	6	4	1
		IINAB	9	4	3	1	6,7	4,7	3	1	9	4,7	3,7	1	6	5,7	3	1
	48	IINIB	9	8,7	9	1	9	6,3	7	1	9	9	6,7	1	8	7	6	1
		IINAB	9	6,7	4	1	7,7	5,7	4,3	1	9	6	5,7	1	7	6	5	1
	72	IINIB	9	9	9	1	9	8,7	7	1	9	9	8,3	1	9	8	8	1
		IINAB	9	8,7	7	1	9	8,3	5	1	9	7,7	7	1	9	7	6	1
	144	IINIB	9	9	9	1	9	9	9	1	9	9	9	1	9	9	9	1
		IINAB	9	9	8	1	9	9	8	1	9	9	8,3	1	9	9	9	1

Tabela (cont.): Intensidade da Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia (IINIB) Intensidade da atividade de Inativação bacteriana/bacteriocida (IINAB) de extratos etanólicos e hidroetanólicos de *Artemisia dracunculus* e *Origanum vulgare* em diferentes concentrações frente a 9 *Salmonellas entéricas* em diferentes tempos de leitura.

Salmonella			Extrato Etanólico								Extrato hidroetanólico								
			<i>Artemisia dracunculus</i>				<i>Origanum vulgare</i>				<i>Artemisia dracunculus</i>				<i>Origanum vulgare</i>				
			Horas	25%	20%	15%	10%	25%	20%	15%	10%	25%	20%	15%	10%	25%	20%	15%	10%
Enteritidis (surto 7)	24	IINIB	9	6	7	1	9	7,3	5	1	9	8,7	7	1	8	6	4,7	1	
		IINAB	9	4	3	1	7,7	6	3	1	9	4,7	4	1	6	5,3	3	1	
	48	IINIB	9	8,7	8,7	1	9	8	7	1	9	9	8	1	8	7	6	1	
		IINAB	9	6,3	4	1	8,3	7,3	4,3	1	9	6	5	1	8	6	4	1	
	72	IINIB	9	9	9	1	9	8,7	7,3	1	9	9	9	1	9	9	8,7	1	
		IINAB	9	8,7	7	1	9	8,3	5	1	9	7,3	6	1	9	6,3	6	1	
	144	IINIB	9	9	9	1	9	9	9	1	9	9	9	1	9	9	9	1	
		IINAB	9	9	8	1	9	9	9	1	9	9	8,3	1	9	9	9	1	
	Branderup (surto 8)	24	IINIB	9	6	7	1	9	6	7	1	9	7,3	7	1	7,3	6	4	1
			IINAB	9	5	3	1	7,7	5,7	3	1	9	5	4	1	6	6	3	1
		48	IINIB	9	9	9	1	9	7,3	8	1	9	9	8,3	1	7,3	7	6	1
			IINAB	9	8	5,3	1	9	7	4	1	9	6	5,3	1	7,3	7	4,7	1
		72	IINIB	9	9	9	1	9	9	8	1	9	9	8,7	1	9	8	7	1
			IINAB	9	9	7	1	9	9	5	1	9	7	6	1	9	7	6	1
144		IINIB	9	9	9	1	9	9	9	1	9	9	9	1	9	9	9	1	
		IINAB	9	9	7,7	1	9	9	8	1	9	9	7,3	1	9	9	9	1	
Enteritidis ATCC (13073) (surto 9)	24	IINIB	9	7	7	1	9	6,7	7	1	9	9	8	1	8	5	3,3	1	
		IINAB	9	4	3	1	6	4,3	3	1	9	4	3	1	5	5	3	1	
	48	IINIB	9	8,3	7,7	1	9	6,7	8	1	9	9	8,3	1	9	6	4	1	
		IINAB	9	7	4	1	9	4,7	3	1	9	5,3	4	1	7,3	6	3	1	
72	IINIB	9	9	9	1	9	9	9	1	9	9	8,7	1	9	7	8,7	1		
	IINAB	9	9	7	1	9	9	5	1	9	6	6	1	9	7	5,3	1		
144	IINIB	9	9	9	1	9	9	9	1	9	9	9	1	9	9	9	1		
	IINAB	9	9	8	1	9	9	9	1	9	9	8,3	1	9	9	9	1		





Leitura das IINIB's e IINAB's

S1	24 h		48h		72h		144h	
	C	S	C	S	C	S	C	S
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								
VA								

S2	24 h		48h		72h		144h	
	C	S	C	S	C	S	C	S
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								
VA								

S3	24 h		48h		72h		144h	
	C	S	C	S	C	S	C	S
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								
VA								

S4	24 h		48h		72h		144h	
	C	S	C	S	C	S	C	S
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								
VA								

S5	24 h		48h		72h		144h	
	C	S	C	S	C	S	C	S
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								
VA								

S6	24 h		48h		72h		144h	
	C	S	C	S	C	S	C	S
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								
VA								

S7	24 h		48h		72h		144h	
	C	S	C	S	C	S	C	S
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								
VA								

S8	24 h		48h		72h		144h	
	C	S	C	S	C	S	C	S
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								
VA								

S9	24 h		48h		72h		144h	
	C	S	C	S	C	S	C	S
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								
VA								

	24 h		48h		72h		144h	
	C	S	C	S	C	S	C	S
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								
VA								

APÊNDICE C- Protocolos de rotina para o controle de procedimentos da técnica de identificação de *Salmonella spp.* conforme MAPA Instrução Normativa N° 62, DE 26 DE AGOSTO DE 2003.

Planta testada		Parte utilizada		
Data de coleta planta		Data de início do teste		
Acesso	Maceração Alcoólica			
Diluições do extrato				
N°	BACTÉRIAS	Tubo 7 (10 <sup>-6</sup> )	Tubo 8 (10 <sup>-7</sup> )	Inóculo inicial
S1	<i>Salmonella</i> Infantis			
S5	<i>Salmonella</i> Derby			
S6	<i>Salmonella</i> Enteritidis			
S8	<i>Salmonella</i> Braenderup			
S9	<i>Salmonella</i> Enteritidis (ATCC 13076)			

Extração do Álcool do Macerado			
<b>G<sub>1</sub></b>	Graduação Alcoólica Aparente (°GL)		Cálculo para retirada de álcool
<b>T</b>	Temperatura (°C)		$V_{ar} = (332 \cdot V_t \cdot G_1) / 35.000$
<b>G<sub>2</sub></b>	Graduação Alcoólica Corrigida (°GL)		
<b>V<sub>t</sub></b>	Volume total filtrado (mL)		
<b>V<sub>ar</sub></b>	Volume de álcool a retirar		
<b>V<sub>e</sub></b>	Volume de extrato		

N° Amostra	Mistura (carne+extrato+bactéria)		Teste com 8 horas		Teste com 24 horas	
	Hora	Dia	Hora	Dia	Hora	Dia
A.1						
A.2						
A.3						
A.4						
A.5						

Controle						
----------	--	--	--	--	--	--

mistura	8 h	24 h
Pré-enriquecimento	16 – 20h	16 – 20h
Enriquecimento seletivo	24 – 30h	24 – 30h
Isolamento	18 - 24h	18 - 24h

Protocolo do teste com os tempos para todas as etapas			
	Pré Enriquecimento	Enriquecimento Seletivo	Isolamento
Tempo (horas)	16 – 20	24 – 30	18 - 24
Temperatura	36 ±1	41 ±0,5	36 ±1

Contagem das placas do teste

Contagem do teste de 8 horas									
XLT4					BPLS				
	RV		TT			RV		TT	
Amostra	C/D	S/D	C/D	S/D	Amostra	C/D	S/D	C/D	S/D
A.1					A.1				
A.2					A.2				
A.3					A.3				
A.4					A.4				
A.5					A.5				
Controle					Controle				

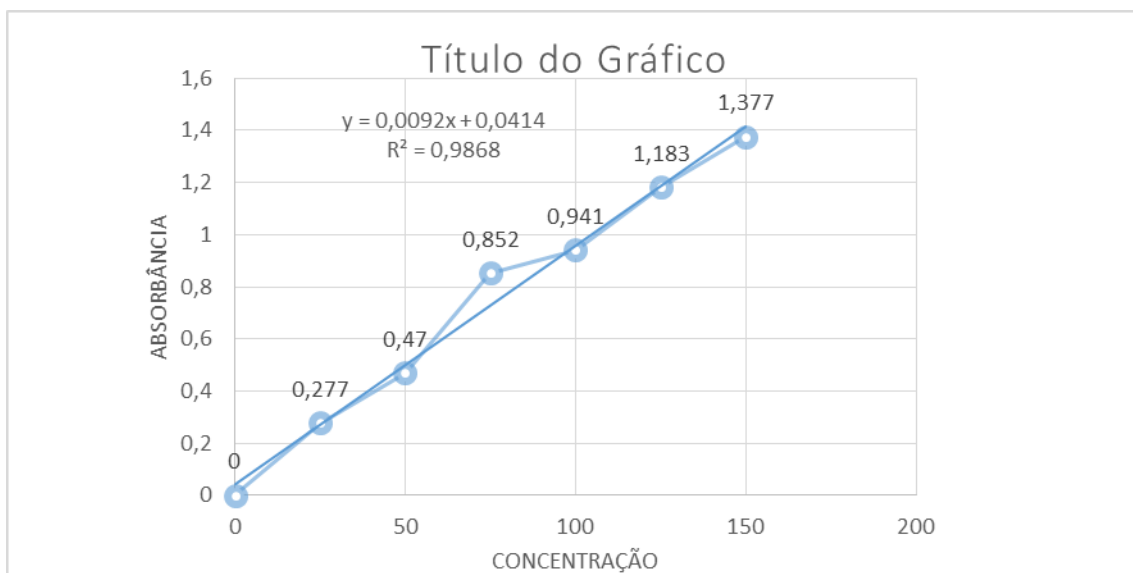
Contagem do teste de 24 horas									
XLT4					BPLS				
	RV		TT			RV		TT	
Amostra	C/D	S/D	C/D	S/D	Amostra	C/D	S/D	C/D	S/D
A.1					A.1				
A.2					A.2				
A.3					A.3				
A.4					A.4				
A.5					A.5				
Controle					Controle				

## APÊNDICE D

Equação da curva de calibração do ácido Gálico

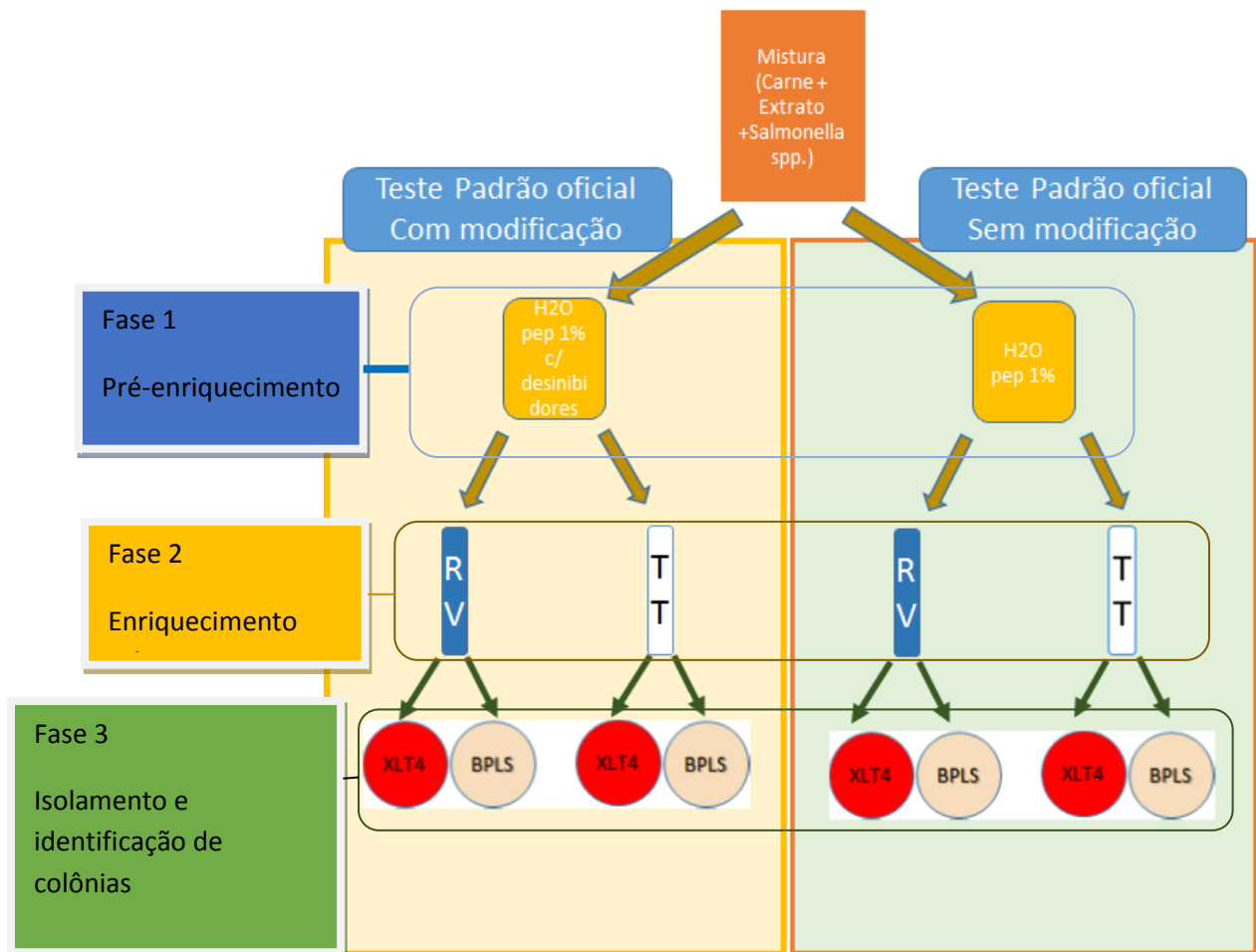
$$Y = 0,0092x + 0,0051$$

Curva padrão do Ácido Gálico



## APÊNDICE E

Esquema do teste de Identificação de *Salmonella* spp. segundo na Instrução Normativa N°62, de 26 de agosto de 2003, MAPA, com modificações na técnica.



RV – Rapaport-Vassiliadis

TT – Tetrionato

XLT4 – Agar Xylose-Lysine-Tergitol 4

BPLS - Agar Brilliant-green Phenol-red Lactose Sucrose

## ANEXO A

## Análises estatísticas

## Variáveis analisadas.

Classificação	níveis	Atributos
Bactérias	9	S. Infantis, S. Enteritidis, S. Enteritidis, S. Enteritidis, S. Derby, S. Enteritidis, S. Enteritidis, S. Braenderup e S. Enteritidis (ATCC 13076)
Concentração	3	25, 20 e 15%
Tempo de contato	4	24, 48, 72, 144 horas
Tipo de extração	2	Etanólico e hidroetanólico
Planta	2	<i>Artemisia dracunculus</i> L. e <i>Origanum vulgare</i> L.

O Programa estatístico utilizado nas análises foi Statistix versão 9.0



### Analysis of Variance Table for IINAB

Source	DF	SS	MS	F	P
BACT (A)	8	23.33	2.917	6.08	0.0000
CONCENTRA (B)	2	1954.85	977.424	2038.94	0.0000
TEMPO (C)	3	2251.12	750.373	1565.30	0.0000
TIPO (D)	1	30.25	30.250	63.10	0.0000
PLANTA (E)	1	65.79	65.790	137.24	0.0000
A*B	16	21.54	1.346	2.81	0.0002
A*C	24	37.57	1.566	3.27	0.0000
A*E	8	5.49	0.686	1.43	0.1793
A*D	8	16.36	2.045	4.27	0.0000
B*C	6	569.36	94.893	197.95	0.0000
B*D	2	22.50	11.252	23.47	0.0000
B*E	2	28.49	14.246	29.72	0.0000
C*D	3	30.26	10.085	21.04	0.0000
C*E	3	45.43	15.144	31.59	0.0000
D*E	1	1.49	1.494	3.12	0.0778
REPETI (F)					
A*B*D*E*F	274	121.54	0.444	0.93	0.7809
Error	933	447.26	0.479		
Total	1295	5672.64			
Grand Mean	7.0324	CV 9.85			

### Analysis of Variance Table for IINIB

Source	DF	SS	MS	F	P
BACT (A)	8	10.01	1.251	3.59	0.0004
CONCENTRA (B)	2	324.40	162.200	465.65	0.0000
TEMPO (C)	3	704.13	234.709	673.81	0.0000
TIPO (D)	1	43.34	43.340	124.42	0.0000
PLANTA (E)	1	241.11	241.112	692.19	0.0000
A*B	16	18.11	1.132	3.25	0.0000
A*C	24	12.84	0.535	1.54	0.0482
A*E	8	3.56	0.445	1.28	0.2511
A*D	8	9.25	1.156	3.32	0.0009
B*C	6	225.48	37.581	107.89	0.0000
B*D	2	36.98	18.488	53.08	0.0000
B*E	2	47.02	23.510	67.49	0.0000
C*D	3	24.69	8.229	23.62	0.0000
C*E	3	116.62	38.873	111.60	0.0000
D*E	1	37.69	37.686	108.19	0.0000
REPETI (F)					
A*B*D*E*F	274	0.345	94.45	0.99	0.5358
Error	933	0.348	324.99		
Total	1295	2274.67			

Grand Mean 8.1674 CV 7.23

### Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of IINAB for Bactéria.

Bactéria	Média	Homogeneidade do grupo
2	7.2222	A
8	7.1736	AB
5	7.1667	AB
7	7.0625	AB
3	7.0278	AB
6	6.9792	ABC
1	6.9583	BC
4	6.9306	BC
9	6.7708	C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0816  
 Critical Q Value 4,385 Critical Value for Comparison 0.2530  
 Error term used: BACT\*CONCENTRA\*TEMPO\*TIPO\*Varietal\*REPETI, 933 DF  
 There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means  
 are not significantly different from one another.

### Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of IINAB for Concentração

Concentração	Média	Homogeneidade do grupo
25	8.5625	A
20	6.9792	B
15	5.5556	C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0471  
 Critical Q Value 3,314 Critical Value for Comparison 0.1104  
 Error term used: BACT\*CONCENTRA\*TEMPO\*TIPO\*Varietal\*REPETI, 933 DF  
 All 3 means are significantly different from one another.

### Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of IINAB for TEMPO

TEMPO	Média	Homogeneidade do grupo
4	8.8364	A
3	7.5648	B
2	6.4475	C
1	5.2809	D

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0544  
 Critical Q Value 3,632 Critical Value for Comparison 0.1397  
 Error term used: BACT\*CONCENTRA\*TEMPO\*TIPO\*Varietal\*REPETI, 933 DF  
 All 4 means are significantly different from one another.

### Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of IINAB for TIPO de extração

TIPO	Média	Homogeneous Groups
1	7.1852	A
2	6.8796	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0385  
 Critical Q Value 2,772 Critical Value for Comparison 0.0754  
 Error term used: BACT\*CONCENTRA\*TEMPO\*TIPO\*Varietal\*REPETI, 933 DF  
 All 2 means are significantly different from one another.

### Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of IINAB for Varietal

Planta	Média	Homogeneous Groups
1	7.2577	A
2	6.8071	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0385  
 Critical Q Value 2,772 Critical Value for Comparison 0.0754  
 Error term used: BACT\*CONCENTRA\*TEMPO\*TIPO\*Varietal\*REPETI, 933 DF

All 2 means are significantly different from one another.

### **Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of IINIB for BACTÉRIA**

Bactéria	Média	Homogeneous Groups
7	8.2778	A
2	8.2708	A
9	8.2153	A
8	8.2153	A
5	8.1736	AB
4	8.1667	AB
3	8.1111	AB
6	8.0903	AB
1	7.9861	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0696  
 Critical Q Value 4,385 Critical Value for Comparison 0.2157  
 Error term used: BACT\*CONCENTRA\*TEMPO\*TIPO\*Varietal\*REPETI, 933 DF  
 There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

### **Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of IINIB for CONCENTRAÇÃO**

Concentração	Mean	Homogeneous Groups
25	8.8380	A
20	8.0278	B
15	7.6366	C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0402  
 Critical Q Value 3,314 Critical Value for Comparison 0.0941  
 Error term used: BACT\*CONCENTRA\*TEMPO\*TIPO\*Varietal\*REPETI, 933 DF  
 All 3 means are significantly different from one another.

### Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of IINIB for TEMPO

Tempo	Mean	Homogeneous Groups
4	9.0000	A
3	8.6358	B
2	7.9722	C
1	7.0617	D

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0464  
 Critical Q Value 3,632 Critical Value for Comparison 0.1191  
 Error term used: BACT\*CONCENTRA\*TEMPO\*TIPO\*Varietal\*REPETI, 933 DF  
 All 4 means are significantly different from one another.

### Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of IINIB for TIPO

TIPO	Mean	Homogeneous Groups
1	8.3503	A
2	7.9846	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0328  
 Critical Q Value 2,772 Critical Value for Comparison 0.0643  
 Error term used: BACT\*CONCENTRA\*TEMPO\*TIPO\*Varietal\*REPETI, 933 DF  
 All 2 means are significantly different from one another.

### Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of IINIB for Planta

Planta	Mean	Homogeneous Groups
1	8.5988	A
2	7.7361	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 0.0328  
 Critical Q Value 2,772 Critical Value for Comparison 0.0643  
 Error term used: BACT\*CONCENTRA\*TEMPO\*TIPO\*Varietal\*REPETI, 933 DF  
 All 2 means are significantly different from one another.

## ANEXO B

Declaração Herbário *Artemisia dracunculus* L.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
Herbário ICN

---

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que os materiais botânicos pertencentes à espécie *Artemisia dracunculus* L., coletados nos municípios de Guaíba e Porto Alegre (RS) em 2003 encontram-se depositados no Herbário do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob o número tomo **ICN 176515 e 176516**, respectivamente.

Esses materiais são testemunhos do projeto “Preditividade diagnóstica de salmonelas em alimentos de origem animal condimentados segundo indicativos sensoriais”, desenvolvido pelo doutorando Giovani Girolometto do Programa de Ciências Veterinárias da UFRGS sob a orientação do professor Dr. José Maria Wiest.

Porto Alegre, 20 de dezembro de 2013.

Dra. Mara Rejane Ritter  
Curadora do Herbário ICN

Anexo C

Declaração Herbário *Origanum vulgare* L.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
Herbário ICN

---

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o material botânico pertencente à espécie *Origanum vulgare* L., coletado no município de Eldorado do Sul (RS) em janeiro de 2010 encontra-se depositado no Herbário do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob o número tomo **ICN 165042**.

Esse material é testemunho do projeto “Preditividade diagnóstica de salmonelas em alimentos de origem animal condimentados segundo indicativos sensoriais”, desenvolvido pelo doutorando Giovani Girolometto do Programa de Ciências Veterinárias da UFRGS sob a orientação do professor Dr. José Maria Wiest.

Porto Alegre, 19 de dezembro de 2013.

Dra. Mara Rejane Ritter  
Curadora do Herbário ICN



## ANEXO D

Resultados de análises Laboratoriais de carne moída de 5 amostras realizadas pelo Centro de Ensino, Pesquisa e Tecnologia de Carnes da Faculdade de Veterinária da UFRGS.

Tipo da análise	Coliformes totais UFC/g	Coliformes a 45 UFC/g	<i>Staphylococcus</i> sp UFC/g	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Clostridium</i> sp. UFC/g
Amostra 1	$2,5 \times 10^4$	$< 1,0 \times 10^3$	$< 1,0 \times 10^3$	Ausente em 25g	$< 1,0 \times 10^3$
Amostra 2	$6,4 \times 10^4$	$< 1,0 \times 10^3$	$< 1,0 \times 10^3$	Ausente em 25g	$< 1,0 \times 10^3$
Amostra 3	$4,4 \times 10^4$	$< 1,0 \times 10^3$	$< 1,0 \times 10^3$	Ausente em 25g	$< 1,0 \times 10^3$
Amostra 4	$6,6 \times 10^4$	$< 1,0 \times 10^3$	$< 1,0 \times 10^3$	Ausente em 25g	$< 1,0 \times 10^3$
Amostra 5	$5,6 \times 10^4$	$< 1,0 \times 10^3$	$< 1,0 \times 10^3$	Ausente em 25g	$< 1,0 \times 10^3$

**CURRICULUM****GIROLOMETTO, GIOVANI****1 DADOS PESSOAIS**

**Nome** Giovanni Girolometto  
**Nascimento** 23/10/1977 - Pato Branco/PR - Brasil  
**CPF** 941.191.129-34

**2 FORMAÇÃO**

- 2004 - 2005** Mestrado em Ciências Veterinárias.  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil  
Título: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE EXTRATOS DE *Ilex paraguariensis* A. St. Hill. ("Erva Mate") FRENTE A BACTÉRIAS ZOONÓTICAS EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL., Ano de obtenção: 2006  
Orientador: José Maria Wiest
- 2011 - 2012** Graduação em Programa Especial de Formação Pedagógica de Docentes.  
Universidade Feevale, FEEVALE, Novo Hamburgo, Brasil
- 1996 - 2002** Graduação em Medicina Veterinária.  
Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, Pelotas, Brasil  
Título: relatório de estágio curricular  
Orientador: Manoel Mendieta Araújo