



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE**

**USO DO EXTRATO DE FOLHAS DO JATOBÁ
(*Hymenaea martiana* Hayne) NA REDUÇÃO DAS CONTAGENS
DE *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* EM
LEITE CRU.**

THIAGO COELHO DE SANTANA

2015



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE**

THIAGO COELHO DE SANTANA

**USO DO EXTRATO DE FOLHAS DO JATOBÁ (*Hymenaea martiana* Hayne) NA
REDUÇÃO DAS CONTAGENS DE *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Staphylococcus
aureus* EM LEITE CRU.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de “Mestre em Ciências”.

Orientadora
Prof^a. Dr^a. Roberta Pereira Fernandes Miranda

Coorientador
Prof. Dr. Mateus MatiuZZi da Costa

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL
2015

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

S231u Santana, Thiago Coelho de
Uso do extrato de folhas do Jatobá (*Hymenaea martiana* Hayne) na redução das contagens de *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em leite cru / Thiago Coelho de Santana ; orientadora Roberta Pereira Fernandes Miranda. – São Cristóvão, 2015.
52 f.

Dissertação (Mestrado em Agricultura e Biodiversidade) – Universidade Federal de Sergipe, 2015.

1. Agrobiodiversidade. 2. Agentes antiinfeciosos. 3. Bactericidas. 4. Plantas. I. Miranda, Roberta Pereira Fernandes, orient. II. Título.

CDU: 631.582.736.2

THIAGO COELHO DE SANTANA

**USO DO EXTRATO DE FOLHAS DO JATOBÁ (*Hymenaea martiana* Hayne) NA
REDUÇÃO DAS CONTAGENS DE *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Staphylococcus*
aureus EM LEITE CRU.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de “Mestre em Ciências”.

APROVADA em 30 de julho de 2015.

Prof. Dr. Mateus MatiuZZi da Costa
UNIVASF
(Coorientador)

Profª. Dra. Larissa Araújo Rolim
UNIVASF



Profª. Dra. Roberta Pereira Fernandes Miranda
UFS
(Orientadora)

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL

*Aos meus pais, por todo o amor e dedicação
para comigo, por terem sido a peça
fundamental para que eu tenha me tornado a
pessoa que hoje sou.*

*A minha família pelo carinho e apoio
dispensados em todos os momentos que
precisei.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado forças e iluminando meu caminho para que eu pudesse concluir mais uma etapa da minha vida; Pai celestial, que por diversas vezes me acolheu em seu colo e me confortou quando eu pensei em desistir; que me consolou enquanto as lágrimas insistiam em rolar pela minha face.

Ao meu pai Gilvandro, por todo amor e dedicação que sempre teve comigo, homem pelo qual tenho maior orgulho de chamar de pai, meu eterno agradecimento pelos momentos em que estive ao meu lado, me apoiando e me fazendo acreditar que nada é impossível, pessoa que sigo como exemplo, pai dedicado, amigo e batalhador. O melhor pai que Deus poderia ter me dado!

A minha mãe Dovete, pela sua fé, por ser tão motivadora e amiga, por ser a pessoa que mais me apoia e acredita na minha capacidade, que escutou cada desabafo e me consolou em meio às lágrimas, moveu céus e terra para que eu não perdesse a minha fé, meu agradecimento pelas horas em que ficou ao meu lado não me deixando desistir e me mostrando que sou capaz de chegar onde desejo, pelo apoio financeiro mesmo quando não tinha de onde prover, sem dúvida foi quem me deu o maior incentivo para conseguir concluir esse trabalho. Serei eternamente grato. A melhor mãe que Deus poderia ter me dado!

Aos amigos que fiz durante o curso, pela verdadeira amizade que construímos em particular aqueles que estavam sempre ao meu lado (Isabela e Nancy) por todos os momentos que passamos durante esses dois anos meu especial agradecimento. Sem vocês essa trajetória não seria tão prazerosa e divertida.

A Lucineide e família (Yasmin, Beatriz e Arismar), por me adotar em seu lar como sobrinho/primo, acompanhando passo a passo essa árdua e compensadora jornada, pelas risadas e palavras de apoio e incentivo. Serei eternamente grato por ter sido acolhido em seu lar no momento que mais precisei e espero um dia poder recompensar tantos momentos felizes ao lado de todos!

Ao André Paviotti, pelo processo de coleta, identificação e localização geográfica das plantas analisadas e por estar de braços aberto em prol da ciência e pesquisa.

A Lucia Kiill, curadora do herbário da Embrapa Semiárido, pelo seu apoio no processo de tombamento.

Ao professor Jackson Almeida, pelo seu apoio e parceria no processo de extração e caracterização do extrato de Jatobá e aos conhecimentos a mim compartilhados. Mais um anjo que Deus colocou em minha vida!

A professora Larissa Rolim, pelo seu apoio e parceria no processo de caracterização do extrato de Jatobá e aos conhecimentos a mim compartilhados. Um ser de luz que acolhe todas as ovelhas desgarradas e que encanta a todos com esse belo sorriso.

A Silvana Martins, pelo seu apoio na realização das análises microbiológicas, pela amizade e carinho, e por estar sempre presente em minha vida profissional, sendo uma referência a ser seguida.

A Aparecida, por ter trilhado comigo o caminho da microbiologia dos alimentos, sendo uma parceira e tanto.

A minha orientadora Roberta Fernandes pela sua sensibilidade e persistência diante dos mais variados contratemplos, apoiando meu mestrado sanduiche e me acolhendo em sua vida acadêmica, como uma mãe acolhe um filho desamparado; e ao meu coorientador Mateus Matiuzzi por me receber de braços abertos em seu laboratório e em sua vida acadêmica.

Pessoa que permitiu que eu não abandonasse essa árdua e gratificante fase de nossas vidas chamada mestrado. Serei eternamente grato por tudo!

A UFS e a UNIVASF por disponibilizar o espaço físico, recursos humanos e a estrutura técnica dos seus laboratórios para a realização dos ensaios e banco de dados utilizados para elaboração deste trabalho.

Ao IF Sertão Campus Ouricuri por disponibilizar um horário especial para a realização dos meus ensaios na UNIVASF e por adequar as minhas férias para a finalização desse trabalho e para a defesa do mesmo.

A CAPES pelo apoio financeiro para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos meus amigos do laboratório da UNIVASF que me ajudaram a desenvolver minha pesquisa (Amanda, Ana Paula, Isamara, Júnior e Nayane) me dando suporte técnico e teórico e me motivando sempre a galgar novos horizontes em busca de um futuro profissional melhor.

A todos os professores do curso de Biotecnologia/Agricultura e Biodiversidade, pela paciência, dedicação e ensinamentos disponibilizados nas aulas, cada um de forma especial contribuiu para a conclusão desse trabalho e conseqüentemente para minha formação profissional; Por fim, gostaria de agradecer aos meus amigos e familiares, pelo carinho e pela compreensão nos momentos em que a dedicação aos estudos foi exclusiva e em que o meu estresse me tornou uma bomba-relógio, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para que esse trabalho fosse realizado meu eterno AGRADECIMENTO.

BIOGRAFIA

THIAGO COELHO DE SANTANA, filho de Maria Dovete Coelho de Santana e Gilvandro Coelho de Santana, nasceu na cidade de Petrolina, no estado de Pernambuco, em 03 de fevereiro de 1989.

Brasileiro, Pernambucano e Petrolinense com muito orgulho. Formado em Tecnologia de Alimentos pelo SENAI CERTA em 2006. Possui CRQ-PE. Licenciado em Ciências Biológicas pela Universidade de Pernambuco - Campus Petrolina (UPE) em 2010. Pós-graduado em Educação Ambiental pela Universidade Cidade de São Paulo (UNICID) em 2012. Em 2013, iniciou o mestrado em Biotecnologia de Recursos Naturais, na Universidade Federal de Sergipe (UFS), onde em 2014 fez a migração para o programa de Pós-Graduação em Agricultura e Biodiversidade tendo o seu mestrado sanduíche junto a UNIVASF. Atua como Técnico em Alimentos e Laticínios no Instituto Federal do Sertão Pernambucano - Campus Ouricuri e possui experiência prática em análises laboratoriais com ênfase na área de microbiologia dos alimentos. Consultor do PAS - Programa Alimento Seguro desde 2011. Professor do PRONATEC desde 2011. Membro do Colegiado Permanente do Curso Técnico em Agroindústria do IF Sertão - Campus Ouricuri.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	ii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
1. INTRODUÇÃO GERAL	16
2. REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1 Plantas medicinais.....	18
2.2 Jatobá	18
2.3 Composição Química do Jatobá	19
2.4 Rutina.....	20
2.5 Leite Cru	21
2.6 Queijo Coalho	22
2.7 Intoxicação Alimentar.....	22
2.7.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	22
2.7.2 <i>Escherichia coli</i>	23
2.7.2 <i>Salmonella</i> spp.	24
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
4. ARTIGO 1: USO DO EXTRATO DE FOLHAS DO JATOBÁ (<i>Hymenaea martiana</i> Hayne) NA REDUÇÃO DAS CONTAGENS DE <i>Salmonella</i> spp., <i>Escherichia coli</i> E <i>Staphylococcus aureus</i> EM LEITE CRU.	31
RESUMO	31
ABSTRACT	32
4.1. Introdução.....	33
4.2. Material e Métodos	34
4.2.1. Coleta do Material Vegetal	34
4.2.2. Preparação do extrato etanólico	34
4.2.3. Análise por CLAE-DAD de Rutina	34
4.2.4. Método de microdiluição	34
4.2.5. Contaminação do leite.....	35
4.2.6. Análise de <i>S. aureus</i>	35
4.2.7. Análise de <i>E. coli</i>	36
4.2.8. Análise de <i>Salmonella</i> spp.	36
4.3. Resultados e discussão.....	37
4.3.1. Obtenção do Extrato Bruto.....	37
4.3.2. Análise Cromatográfica em CLAE-DAD	37
4.3.3. Método de microdiluição	37
4.3.4. Análise Microbiológica	37

4.4 Conclusão	39
4.5. Referências.....	39
5. CONCLUSÕES GERAIS	50
ANEXOS.....	51

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Cromatogramas em função do tempo de retenção. a. Cromatograma Padrão da Rutina (28,55±1,3min.) b. Cromatograma do extrato de folhas do Jatobá (<i>Hymenaea martiana</i> Hayne) com a presença da Rutina (28,55±1,3min.) por espectros de absorção de ultravioleta e a presença de outros compostos majoritários não identificados.....	44
2	a. Espectro de absorção de ultravioleta ($\lambda_{M\acute{a}x}$. 255,74 e 353,44) da rutina por meio do comprimento de onda (nm) e absorbância (mAU). b Gráfico referente à curva de calibração do padrão analítico rutina, com o R^2 de 0,9813. O padrão analítico RUT foi avaliado nas concentrações de 1,44 a 2,16 $\mu\text{g/mL}$ para construção da curva de calibração demonstrada. A partir desses resultados foi possível calcular a quantidade de Rutina presente no extrato sendo observado 106,25±10,84 μg de rutina/mg de extrato.....	45
3	Extrato etanólico das folhas de <i>Hymenaea martiana</i> Hayne. Em 200 μL de extrato a quantidade de rutina é 531,35 μg	46
4	Material vegetal das folhas de <i>Hymenaea martiana</i> Hayne. a Presença do fruto e folhas em estado de maturação. b Presença das flores em estado de maturação.....	47
5	Árvore de <i>Hymenaea martiana</i> Hayne (Jatobá) com a presença de toda a estrutura vegetativa.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Contagem de <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> e <i>Salmonella</i> spp. no leite UHT após a contaminação das concentrações 10^2 , 10^4 e 10^8 nos tempos zero, doze e vinte e quatro horas.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ATCC	American Type Culture Collection
APPCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
BHI	Brain Heart Infusion
BG	Brilliant Salmonella Shigella Agar
BP	Baird-Parker Agar
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CAFMA	Central de Análise de Fármacos, Medicamentos e Alimentos
CBM	Concentração Bacteriana Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
°C	Grau Celsius
C ₂ HF ₃ O ₂	Ácido Trifluoroacético
DAD	Detector Diode Array
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
g	Grama
GRIN	Germoplasma Resources Information Network
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
H ₂ O	Água
ICMSF	International Commission on Microbiological Specifications for Foods
ILDIS	International Legume Database & Information Service
Kg	Kilograma
L	Litro
LIA	Lysine Iron Agar
Log	Logaritmo
mg	Miligrama
mL	Mililitro
min	Minuto
MH	Muller-Hinton
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
pH	Potencial hidrogeniônico
RUT	Rutina
SE's	Enterotoxinas Estafilocócicas
TSI	Triple Sugar Iron Agar
µg	Microgramas
µL	Microlitros
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UHT	Ultra-High Temperature
UNIVASF	Universidade Federal do Vale do São Francisco
USDA	United States Department of Agriculture
UV	Radiação Ultravioleta
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
VRBA	Violet Red Bile Agar
λ	Lambda
±	Mais ou Menos

RESUMO

SANTANA, Thiago Coelho de. **USO DO EXTRATO DE FOLHAS DO JATOBÁ (*Hymenaea martiana* Hayne) NA REDUÇÃO DAS CONTAGENS DE *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* EM LEITE CRU**. São Cristóvão: UFS, 2015. 52p. (Dissertação – Mestrado em Agricultura e Biodiversidade).*

Hymenaea martiana Hayne é uma espécie arbórea conhecida como “Jatobá” ou “Jatobá-da-mata”. É uma planta típica dos biomas cerrado e caatinga, sendo este último o único bioma exclusivamente brasileiro e grande parte do seu patrimônio biológico não pode ser encontrado em nenhum outro lugar do planeta. As plantas do gênero *Hymenaea* são comumente utilizadas na medicina tradicional brasileira para o tratamento de processo inflamatório, infecções bacterianas, reumatismo e anemia. Os extratos vegetais possuem substâncias produzidas pelo metabolismo secundário, com capacidade de inibir bactérias e outros micro-organismos. As moléculas presentes nos extratos vegetais, como os compostos fenólicos, alcaloides, flavonóides e terpenos são ativos contra vírus, bactérias e fungos. Um dos principais desafios da produção tradicional de alimentos é garantir a segurança dos mesmos. O leite não pasteurizado tem sido um veículo de doenças de origem alimentar. Este produto e seus derivados têm sido frequentemente implicados na intoxicação alimentar por *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. O objetivo desse estudo foi usar extrato de jatobá, identificar os compostos presentes e avaliar sua atividade antimicrobiana. O material biológico foi coletado e a seguir preparado o extrato etanólico, o qual foi analisado por meio CLAE-DAD. A partir da análise de CLAE-DAD, foi possível identificar a rutina (106 µg/mg) como um dos compostos majoritários do extrato de folhas do jatobá. Para o extrato etanólico das folhas de *H. martiana* houve atividade antimicrobiana frente às cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923, *E. coli* ATCC® 35218 e *S. enterica* subsp. *enterica* serovar *Choleraesuis* ATCC® 10708 sendo a concentração bacteriana mínima de 125,3 µg/mL, 781,2 µg/mL e 1.562,5 µg/mL respectivamente. Para os testes antimicrobianos in vivo observou-se que o extrato possui poder bactericida na concentração de 10² UFC/mL. Dessa forma o extrato de folhas do Jatobá possui potencial para o uso na redução da carga microbiana do leite para à produção de queijo coalho, visando à redução de doenças veiculadas por alimentos.

Palavras-chave: Extrato alcoólico, antimicrobiano, CLAE-DAD .

* Comitê Orientador: Roberta Pereira Fernandes Miranda – UFS (Orientador), Mateus Matiuzzi da Costa – UNIVASF (Coorientador).

ABSTRACT

SANTANA, Thiago Coelho de. **USE OF JATOBÁ (*Hymenaea martiana* Hayne) LEAVES EXTRACT IN REDUCTION OF *Salmonella* spp., *Escherichia coli* AND *Staphylococcus aureus* COUNTS IN RAW MILK.** São Cristóvão: UFS, 2015. 52p. . (Thesis - Master of Science in Agriculture and Biodiversity).*

Hymenaea martiana Hayne is an arboreal species known as "Jatobá" or "Jatobá-da-mata". It is a typical plant of Cerrado and Caatinga biomes, the latter being the only exclusively Brazilian biome and much of its biological heritage can not be found anywhere else on the planet. The plants *Hymenaea* genus are commonly used in Brazilian traditional medicine for the treatment of inflammation, bacterial infections, rheumatism and anemia. The plant extracts have substances produced by the secondary metabolism, with ability to inhibit bacteria and other microorganisms. The molecules present in plant extracts, such as phenolic compounds, alkaloids, flavonoids and terpenes are active against viruses, bacteria and fungi. One of the main challenges of traditional food production is to ensure the safety. The unpasteurized milk has been a vehicle of foodborne diseases. This product and its derivatives have often been implicated in food poisoning *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. The aim of this study was to use Jatobá extract, identify compounds and evaluate their antimicrobial activity. The organic material was collected, and then the ethanolic extract prepared, which was analyzed by HPLC-DAD. From the HPLC-DAD analysis, it was possible to identify rutin (106 µg/mg) as one of the major compounds of the locust tree leaf extract. For the ethanol extract of *H. martiana* sheets were antimicrobial activity against strains of *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923, *E. coli* ATCC® 35218 and *S. enterica* subsp. *enterica* serovar *Choleraesuis* ATCC® 10708 being the minimal bacterial concentration of 125.3 µg/mL, 781.2 µg/mL and 1562.5 µg/mL respectively. For antimicrobial tests in vivo it was observed that the extract possesses bactericidal power in the concentration of 10² CFU/mL. Thus the leaf extract of Jatobá has potential for use in reducing microbial load of milk for the production of cheese curds, in order to reduce diseases transmitted by food.

Keywords: Alcoholic extract, antimicrobial, HPLC-DAD.

* Supervising Committee: Roberta Pereira Fernandes Miranda – UFS (Supervisor), Mateus Matiuzzi da Costa – UNIVASF (Co-supervisor).

1. INTRODUÇÃO GERAL

O interesse na busca de compostos bioativos de origem natural nas últimas décadas deve-se à demonstração científica da eficácia de tais compostos contra várias doenças. Diferentes fontes de compostos bioativos têm sido estudadas ao longo dos anos, sendo as plantas as mais promissoras com o objetivo de se encontrar novas moléculas com potencial antimicrobiano (HERRERO et al., 2013).

Diversas plantas medicinais da Caatinga são utilizadas para tratar muitas doenças, incluindo doenças do sistema gastrointestinal, tuberculose e infecções. Porém, muitos estudos etnobotânicos ainda não tiveram sua eficácia cientificamente comprovada, o que gera a necessidade de estudos etnofarmacológicos que possam comprovar as indicações populares. O Brasil possui o maior índice de biodiversidade do mundo, mas, apesar disso, o potencial econômico e terapêutico de muitas plantas medicinais ainda é pouco conhecido (OLIVEIRA, 2015).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente 25% dos medicamentos hoje utilizados são derivados direta ou indiretamente do legado sobre o uso de plantas medicinais, sendo esta porcentagem ainda maior atingindo 60% se consideradas classes específicas de medicamentos como, por exemplo, antimicrobianos e antitumorais (PROBST, 2012).

A segunda maior família em importância medicinal é a Leguminosae destacando-se os gêneros *Hymenaea courbaril*, *Hymenaea stigonocarpa* e *Hymenaea martiana*. *Hymenaea martiana* Hayne, é uma espécie arbórea conhecida como “Jatobá” (CIPRIANO et al., 2014).

Os extratos de partes do Jatobá possuem atividade antimicrobiana, e vêm sendo estudados como agentes antimicrobianos para serem utilizados em alimentos.

O leite não pasteurizado tem sido um veículo de doenças de origem alimentar ao longo da história da indústria de laticínios (D'AMICO et al., 2010). *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* O157: H7 são patógenos de grande preocupação para a indústria de laticínios (OULAHAL et al., 2008).

Em um leite cru, contaminado com uma contagem superior a 10^5 UFC/mL de *S. aureus*, pode ocorrer à produção de enterotoxinas, e mesmo que a pasteurização mate as células de *S. aureus*, as enterotoxinas produzidas mantem a sua atividade, pois são termotolerantes. Além disso, a pasteurização elimina também enzimas e o microbioma indígena, que são, em partes, responsáveis pelo desenvolvimento do sabor e textura típicos de queijo elaborados com leite cru (MEDVED'OVÁ & VALÍK, 2012).

Queijos artesanais, como o de coalho, são típicos da região Nordeste. A produção de queijo de coalho artesanal, a partir de leite cru, é uma atividade tradicional em vários municípios. Os queijos são fabricados em pequenas propriedades rurais ou em pequenas indústrias que não adotam as Boas Práticas de Fabricação (BPF), não apresentam segurança microbiológica e padronização da qualidade. Essa atividade, além de ser uma das principais geradoras de renda dessa região, caracteriza a identidade sócio-cultural regional. Como os queijos de coalho artesanais são fabricados a partir de leite cru e este não é submetido a tratamento térmico, o risco do produto ser veiculador de micro-organismos patogênicos resulta em uma importante questão de saúde pública. Esse procedimento irregular é um dos principais motivos das DTA's (Doenças Transmitidas por Alimentos), provocando nos consumidores intoxicação alimentar e danos a sua saúde (WELKER et al., 2010).

Uma vez que o extrato de Jatobá possui um potencial antimicrobiano este pode ser utilizado na formulação do queijo de coalho produzido com leite cru, reduzindo a níveis aceitáveis a carga microbiana desse alimento. Por se tratar de uma planta nativa, o Jatobá é uma ferramenta em potencial e de baixo custo para a elaboração e comercialização desse produto, garantindo assim uma maior segurança de quem o consome o queijo.

Esse extrato além de trazer benefícios aos pequenos produtores de leite e derivados pode ser futuramente utilizado em grande escala na redução microbiana de outros alimentos, reduzindo custos operacionais, agregando valor ao produto e contribuindo para a preservação e disseminação dessa espécie que está em extinção, já que as folhas ao serem retiradas crescem novamente, reduzindo o impacto biológico das árvores e sendo a quantidade utilizada de extrato mínima para a formulação.

Dessa forma, o objetivo desse estudo foi preparar o extrato, identificar os compostos presentes e avaliar a atividade antimicrobiana de jatobá.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Plantas medicinais

O Reino vegetal desempenha um importante papel na vida de seres humanos e animais por produzir extratos vegetais para a elaboração de medicamentos. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de três quartos da população do mundo atualmente usam extratos de plantas e outras formas de medicamentos tradicionais, tais como partes de animais e minerais para o tratamento de doenças, sejam respiratórias, circulatórias, infecções e inflamações. Tem sido também reportado que mais de 50% de todos os medicamentos modernos, em uso clínico são derivadas de produtos naturais (GOVIND et al., 2009).

O uso de plantas no tratamento de enfermidades é tão antigo quanto a espécie humana, existindo vários registros históricos sobre a utilização das plantas para o tratamento de doenças desde 4000 a.C. Os órgãos das plantas como as raízes, caules, folhas e frutos, para uso medicinal são, em algumas comunidades, as únicas fontes disponíveis de recursos terapêuticos. As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, mantendo o hábito do consumo dessas preparações naturais (SOUZA, 2008).

Planta Medicinal segundo a ANVISA é toda planta ou partes dela que contenham as substâncias ou classes de substâncias responsáveis pela ação terapêutica (BRASIL, 2010). A fitoterapia é caracterizada pelo tratamento com o uso de plantas medicinais e suas diferentes formas farmacêuticas, sem a utilização de princípios ativos isolados permitindo que o ser humano se reconecte com o ambiente, acessando o poder da natureza para ajudar o organismo a normalizar funções fisiológicas prejudicadas, restaurar a imunidade enfraquecida, promover a desintoxicação e o rejuvenescimento (FIRMO et al., 2011).

O grande potencial da biodiversidade brasileira estimula o desenvolvimento de novos produtos, como produtos químicos, medicamentos e alimentos (ASSIS et al., 2015). No Brasil os estudos de plantas medicinais com atividade antimicrobiana têm aumentado consideravelmente nos últimos anos, mas esse número ainda é baixo quando se leva em consideração a biodiversidade brasileira. A atividade antimicrobiana decorre de componentes presentes nas plantas, como: terpenóides, óleos essenciais, alcaloides, lectinas, polipeptídeos, substâncias fenólicas e polifenóis (ALENCAR, 2015).

Um dos maiores desafios na determinação do efeito farmacológico de um extrato tem sido a elucidação de compostos ativos. As plantas contêm inúmeros constituintes em seus extratos. Quando testados podem apresentar efeitos sinérgicos ou antagônicos e isso se deve a presença de inúmeros e diferentes compostos químicos nesse extrato (SANTOS, 2011).

2.2 Jatobá

Ocupando quase 10% do território nacional, a caatinga é o único bioma exclusivamente brasileiro, onde grande parte do seu patrimônio biológico não pode ser encontrado em nenhum outro lugar do planeta. Rica em biodiversidade e espécies endêmicas, a Caatinga abriga animais e plantas adaptados à escassez de água. (CAVALCANTE, 2009). Esse bioma continua passando por um extenso processo de alteração e deterioração ambiental provocado pelo uso insustentável dos seus recursos naturais, o que está levando à rápida perda de espécies únicas, à eliminação de processos ecológicos chaves e à formação de extensos núcleos de desertificação em vários setores da região (CARDOSO, 2011).

O impacto da ação humana pode elevar ou reduzir a biodiversidade. Nesse sentido, os esforços de conservação devem identificar e promover sistemas locais de conhecimento e manejo do ambiente que permitam às comunidades locais conservar e aumentar a diversidade biológica como parte de seus modos de vida (GIRALDI & HANAZAKI, 2010). Como destaque desse bioma, podemos citar a *Hymenaea martiana* Hayne.

Hymenaea martiana Hayne é uma árvore típica dos biomas cerrado e caatinga, sendo essa espécie um dos representantes utilizados na medicina popular, assim como os de outras espécies do gênero (SILVA et al., 2012).

A segunda maior família em importância econômica, medicinal, alimentícia, ornamental e madeireira é a Leguminosae. (CIPRIANO et al., 2014). Dentre seus gêneros, destaca-se o *Hymenaea*, considerado predominantemente neotropical e constituído de 16 espécies, das quais 13 dessas espécies são encontradas no Brasil (KODAMA et al., 2007).

Hymenaea é um dos poucos gêneros com mais de dez espécies que não recebe revisão taxonômica há mais de três décadas (PESTANA, 2010). A delimitação dos táxons em *Hymenaea* é baseada principalmente em caracteres biométricos e reprodutivos que sesobrepõem, sobretudo de folhas, estruturas florais e frutos (LEE & LANGENHEIM, 1975), tornando assim uma identificação precisa muito difícil.

As plantas de *Hymenaea*, popularmente conhecidas como “jatobás”, são árvores que possuem de 8 a 20 metros de altura, troncos retos e cilíndricos, de súber liso e de coloração cinza. As folhas são compostas, bifolioladas, de filotaxia alterna com estipulas e pecíolo livre do lado interno. A floração e a frutificação têm início entre oito e doze anos de idade da planta, e não são necessariamente anuais. No Brasil, florescem durante os meses de dezembro a fevereiro e os frutos amadurecem entre os meses de agosto e setembro. Suas flores são hermafroditas, diclamídeas e pentâmeras, com cálice gamossépalo e corola dialipétala, com 10 estames e um pistilo (BARROSO, 1991; PESTANA, 2010; SOUZA et al., 2014).

O fruto possui formato de vargem unicarpelar, apresentando sabor e aroma adocicados, aspecto farináceo, polpa amarelada, alto teor de fibra alimentar, além de expressivas quantidades de potássio, magnésio, zinco e cálcio, e são muito utilizados na alimentação humana (fabricação de pães, bolos, biscoitos, mingaus e licores) e animal (BATISTA et al., 2011).

Outra peculiaridade do jatobá são as baixas exigências nutricionais e hídricas requeridas pela espécie em ambientes naturais, sendo observada sua presença em terrenos que apresentam solos distróficos e bem drenados (NASCIMENTO et al., 2011).

As plantas do gênero *Hymenaea* são comumente utilizadas na medicina tradicional brasileira para o tratamento de processo inflamatório, infecções bacterianas, reumatismo e anemia (SILVA, 2009). As espécies deste gênero de maior importância econômica e medicinal são a *Hymenaea courbaril*, *Hymenaea stigonocarpa* e *Hymenaea martiana*, encontradas principalmente em vegetação de cerrado (CIPRIANO et al., 2014).

O Jatobá é uma das plantas medicinais brasileiras de maior destaque, seja pelo uso da casca, da entrecasca, das folhas ou do fruto, que são utilizados na forma de chá, infusão, decocção, lambedor e xarope como indicação terapêutica da gripe, béquico, anemia e depurativo (SILVA, 2015).

Hymenaea martiana Hayne, é uma espécie de árvore conhecida como “Jatobá” ou “Jatobá-da-mata” (CIPRIANO et al., 2014; ALMEIDA et al., 2012), encontrada no Brasil (Alagoas, Bahia, Ceará, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais e Pernambuco) e no Paraguai. Ela é uma espécie do gênero *Hymenaea*, pertencente à família: Fabaceae (alt. Leguminosae), subfamília: Caesalpinioideae e tribo: Detarieae, (THE PLANT LIST, 2015; USDA, 2015; ILDIS, 2015).

Hymenaea martiana Hayne pode ser empregada na arborização urbana e em programas de recuperação de áreas naturais degradadas (LORENZI et al., 2005; PESTANA, 2010).

2.3 Composição Química do Jatobá

O gênero *Hymenaea* é reconhecido como fonte de compostos fenólicos. Estudos sugerem que a sua atividade antioxidante esteja relacionada à presença de polifenóis e flavonoides. Os compostos fenólicos possuem atividade antioxidante relacionada

principalmente com suas propriedades redutoras e estrutura química, que contém anel benzênico com grupos hidroxilas associado diretamente à estrutura cíclica, agindo através da doação de átomos de hidrogênio ou de elétrons, o que transforma os radicais em substâncias estáveis (MIRANDA, 2014).

Dentre os compostos fenólicos destacam-se os flavonoides, que estão amplamente distribuídos nas folhas, sementes, cascas e flores das plantas. De acordo com as substituições em sua estrutura eles podem ser divididos em várias classes tais como, flavonóis (quercetina), flavonas (rutina), flavanóis (catequina), flavanonas (naringenina), isoflavonas (genisteína) e antocianinas (cianidina). Muitos estudos têm demonstrado os efeitos dos flavonoides sobre os sistemas biológicos, tais como atividade antiinflamatória, vasodilatadora, antiplaquetária e antimicrobiana (FIGUEIREDO, 2014; COSTA et al., 2014; ALMEIDA et al., 2012).

As espécies deste gênero são conhecidas por produzirem resinas, muito utilizada na fabricação de vernizes, cola, incenso e remédios caseiros (BEZERRA et al., 2013; MARANHÃO et al., 2013). Estas resinas são ricas em terpenos e estes são encontrados de acordo com o órgão de produção. Sesquiterpenos são encontrados na resina presente nas folhas, enquanto no tronco e raízes de árvores maduras a resina é constituída principalmente por diterpenoides. O extrato hidroetanólico da semente de *H. courbaril* apresentou maior conteúdo de fenóis totais (464,34mg Equivalente Ácido Gálico/g de extrato seco) e flavonoides totais (442,25mg Equivalente Rutina/g de amostra) (FIGUEIREDO, 2014).

A seiva do Jatobá apresenta as mesmas propriedades que o chá elaborado a partir da casca, sendo um fortalecedor do sistema imunológico. O extrato hidroacetônico de suas folhas após partição, fracionamento e análise cromatográfica, mostrou-se rico em flavonoides (canferol, quercetina, quercitrina e rutina). Foi observado que a fração orgânica apresentou, in vitro, atividade antifúngica para *Candida clodsporoides* e *Candida sphaerospermum* e atividade anticolinesterásica. Estudos fitoquímicos detectaram a presença de diterpenos na resina exsudada pelo tronco e em extratos da casca de Jatobá. Após ser analisado cromatograficamente o óleo essencial extraído da resina de *H. courbaril*, foi possível a identificação de 83,5% de sua composição química. Sendo observados os seguintes constituintes: β -cariofileno (60,5%), Óxido cariofileno (20,7%) e α -Humuleno (2,3%). Neste mesmo estudo, o óleo essencial apresentou atividade antimicrobiana frente à *Salmonella thiphimurium*, *S. aureus*, *E. coli*, *Streptococcus haemolyticus* e *Pseudomonas aeruginosa* (FIGUEIREDO, 2014; COSTA et al., 2014; ALMEIDA et al., 2012).

Estudos avaliando a atividade antimicrobiana de três espécies vegetais obtiveram resultados positivos em relação ao extrato hidroalcoólico de *H. martiana* contra *Bacillus stearothermophilus* (ATCC 1262), *Micrococcus luteus* (ATCC 9341), *S. aureus* (ATCC 6538), *S. aureus* (ATCC 2722) e *S. aureus* (ATCC 10495). Observou-se que para a cepa MRSA, o jatobá apresentou CBM de 10.417 μ g/mL, e em relação aos demais isolados de *S. aureus*, também apresentou atividade antimicrobiana, com inibição de 99,4%. Em relação à atividade antimicrobiana de *Hymenaea courbaril*: frente a *E. coli* (CBM de 104,2 mL), *Salmonella* spp. (CBM de 145,8 mL), *S. aureus* (CBM de 104,2 mL), *Yersinia enterocolitica* (CBM de 62,5 mL), *Listeria* spp. (CBM de 291 mL) e *Vibrio* spp. (CBM de 67,71 mL) (FIGUEIREDO, 2014).

2.4 Rutina

A avaliação do potencial antimicrobiano de substâncias presentes em extratos e óleos essenciais (de caules, raízes, folhas e frutos), tem sido objeto de incessantes estudos. Os compostos fenólicos, alcalóides e flavonóides e os terpenos são ativos contra vírus, bactérias e fungos. A concentração dos constituintes ativos e a proporção relativa dos componentes da mistura dos metabolitos secundários podem sofrer influência de fatores como clima, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrição, altitude, poluição atmosférica, tipo de solo, índice pluviométrico e época de coleta, bem como a idade e o desenvolvimento da planta (SOUZA, 2008).

Na natureza há um grande número de diferentes tipos de compostos antimicrobianos. Derivado da estrutura de base fenol (Hidroxibenzeno), o termo "fenólicos" refere-se a qualquer composto com uma estrutura do tipo fenol. Existem três classes de compostos fenólicos em termos de estruturas químicas, que vão desde uma estrutura relativamente simples até as mais complexas: não-flavonóides, flavonóides e taninos. Os compostos fenólicos podem afetar o crescimento e metabolismo de bactérias. Eles podem ter um efeito ativador ou inibidor sobre o crescimento microbiano em função da sua constituição e concentração (VAQUERO et al., 2007).

Os flavonóides são compostos polifenólicos, encontrados somente em plantas. Estes compostos são absorvidos no trato gastrointestinal de homens e animais e são excretados intactos ou como metabólitos na urina e fezes (SILVA et al., 2001).

Durante séculos, preparações que contêm flavonóides como principais constituintes fisiologicamente ativos foram utilizados por médicos e curandeiros leigos na tentativa de tratar doenças humanas. Os flavonóides também têm atividade inibidora contra uma variedade de vírus. Por exemplo, a rutina possui atividade contra até sete tipos de vírus, incluindo o vírus do herpes simples (CUSHNIE & LAMB, 2005).

A rutina é um flavonol glicosídico pertencente a uma importante classe de flavonóides, sendo extensamente encontrados na natureza. Ela apresenta uma importância terapêutica em virtude de determinar a normalização da resistência e permeabilidade das paredes dos vasos capilares, além de inibir o processo de formação de radicais livres em vários estágios. A sua aplicação em formas farmacêuticas para o uso externo é muito limitada devido a sua baixa solubilidade em água. As principais fontes de rutina são *Sophora japonica* L., uma árvore encontrada no norte e centro da China (de seus botões e flores são extraídos 15 a 20% de rutina) e *Fagopyrum esculentum*, conhecido como o trigo sarraceno (suas folhas apresentam 2-8% de rutina dependendo de suas variações). Aqui no Brasil a principal fonte é a *Dimorphandra mollis*, o fruto do faveiro (contém rutina na proporção de 8 g para 100 g de pericarpo) (PEDRIALI, 2005).

A rutina é um composto fenólico da classe dos flavonóides, que apresenta potente atividade antioxidante, prevenindo ou sendo utilizada no tratamento da insuficiência venosa ou linfática e da fragilidade ou permeabilidade capilar, na prevenção aos danos causados pela radiação ultravioleta (VELASCO et al., 2008).

A rutina foi identificada em uma amostra de mel com a mais elevada atividade antimicrobiana. Este flavonóide tem sido previamente identificado como o responsável pela atividade antibacteriana. Verificou-se que a rutina apresenta atividade inibitória contra *S. aureus*, *P. vulgaris*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. Typhi* e *E. aerogens* (PIMENTEL et al., 2013).

2.5 Leite Cru

O leite é definido como o produto da secreção mamária de mamíferos, sendo constituído por proteínas, gorduras, carboidratos, vitaminas, sais minerais e água. A composição do leite o transforma em um alimento altamente nutritivo e de fácil assimilação, condição que o torna adequado para o consumo humano. Devido as suas características físicas, químicas e biológicas, o leite é um produto delicado e altamente perecível, sendo facilmente alterado pela ação de microrganismos (MALDANER, 2011). Assim, o leite e produtos lácteos podem levar a surtos de toxinfecções alimentares, causados por uma variedade de microrganismos que encontram um meio ideal de crescimento (WINCK et al., 2010).

Leite e produtos lácteos têm sido frequentemente implicados na intoxicação alimentar estafilocócica e o leite cru contaminado é muitas vezes o envolvido. Manipuladores, equipamentos de ordenha, o ambiente, úbere e tetas dos animais são outras possíveis fontes de contaminação, assim como o atraso no processamento, refrigeração inadequada, má higiene pessoal e contaminação pós-processo (KHIABANI et al., 2014).

O consumo de leite cru e queijo produzido a partir de leite cru constitui um risco para a saúde, em particular quando as crianças ou membros de outras populações sensíveis estão envolvidos (JOHLER et al., 2015a). Problemas de saúde pública associados ao consumo de leite não pasteurizado e produtos de leite cru são bem documentados (PENG et al., 2011).

No leite ordenhado adequadamente, as contagens típicas de *S. aureus* são de 100-200 UFC/mL. No caso de um úbere contaminado (Ex.: mastite), as contagens podem aumentar para 10^4 UFC/mL (MEDVED'OVÁ & VALÍK, 2012). Abuso térmico, isto é, à temperatura de refrigeração acima de 4°C durante a armazenagem de leite, pode promover um aumento da concentração de *S. aureus* (SPANU et al., 2014), assim como de *E. coli* e *Salmonella* spp.

O uso do extrato do Jatobá visa reduzir a carga microbiana do leite, sendo uma alternativa contra a resistência da utilização da pasteurização lenta do leite pelo produtor. Vale salientar que o uso do extrato no leite não exclui a necessidade das boas práticas de fabricação durante a ordenha.

2.6 Queijo Coalho

Queijos de leite cru produzido em uma área limitada, usando o conhecimento tradicional transmitida ao longo de gerações, são legitimamente incluídos na definição de alimentos tradicionais. Um dos principais desafios da produção tradicional de alimentos é garantir a segurança dos alimentos (MILIONI et al., 2015). A utilização de leite cru para a produção de queijo tradicional pode ser entendido como uma prática de alto risco (D'AMICO et al., 2008).

A segurança e qualidade dos alimentos crus fermentados são geralmente determinadas pela presença de micro-organismos patogênicos e deteriorantes, sua interação com bactérias do ácido láctico, intrínsecas, fatores extrínsecos e tecnológicos. A falta de medidas de higiene adequadas durante o processamento de alimentos aumenta as contagens de *S. aureus*, especialmente em alimentos preparados manualmente. Portanto, *S. aureus* pode contaminar também leite tratado termicamente e pode, posteriormente, estar presente em queijos preparados a partir de leite cru e pasteurizado. Geralmente, queijos são considerados como um dos alimentos mais seguros atualmente consumidos. No entanto, bactérias patogênicas que podem ser transmitidas por produtos lácteos não podem ser subestimadas. Historicamente, houve vários surtos relacionados com o consumo de queijos. Os organismos responsáveis predominantemente relatados são *L. monocytogenes*, *E. coli*, *Salmonella* spp. e *S. aureus*. (MEDVED'OVÁ & VALÍK, 2012; HUNT et al., 2012).

Queijos elaborados a partir de leite cru são geralmente caracterizados por possuírem um sabor mais forte e mais rico em comparação com queijos produzidos a partir de leite pasteurizado (FUKA et al., 2013).

A obtenção do leite cru com o extrato do Jatobá permitirá a elaboração do queijo coalho sem perdas das características organolépticas do produto provocados pela pasteurização.

2.7 Intoxicação Alimentar

2.7.1 *Staphylococcus aureus*

O rastreio de microorganismos ao longo da cadeia alimentar tornou-se um instrumento indispensável na segurança dos alimentos nos últimos anos (STESSL et al., 2014).

Staphylococcus aureus é uma bactéria patogênica, cuja doença transmitida por alimentos (DTA) é classificada pela International Commission on Microbiological Specifications for Foods – ICMSF, no grupo de risco III, que inclui as doenças “de perigo moderado, usualmente de curta duração e sem ameaça de morte ou sequelas, com sintomas auto limitados, mas que causam severo desconforto”. A ingestão de uma dose menor que 1 µg

de toxina pode provocar sintomas da intoxicação e essa quantidade é atingida quando a população de *S. aureus* alcança valores acima de 10^6 UFC/g de alimento (SILVA, 2010).

S. aureus subsp. *aureus* (*S. aureus*) pertence ao gênero *Staphylococcus* e a família Staphylococcaceae. O *S. aureus* foi primeiramente descrito por Sir Alexander Ogston em 1882 e dois anos mais tarde, Rosenbach isolou em uma cultura pura e introduziu o nome *S. aureus*. O nome do organismo é derivado a partir das palavras gregas staphyle (um cacho de uvas) e cocos (grãos ou baga). *S. aureus* é uma bactéria gram-positiva, anaeróbia facultativa, catalase-positiva, oxidase-negativa, sem motilidade e não formam esporos. Os principais substratos utilizados por este organismo são os açúcares (glucose, frutose, galactose, manose, ribose, maltose, sacarose, trealose), álcoois (manitol), ácidos orgânicos (acetato), e em algumas condições aminoácidos (glutamina, arginina). Uma característica que distingue o *S. aureus* de outras bactérias patogênicas é a sua elevada tolerância a baixos valores de atividade de água e concentrações de NaCl até 20% (halotolerantes). São mesófilos com temperatura ótima de crescimento entre 37°C a 40°C, e temperatura mínima para o crescimento de cerca de 7,0°C. São capazes de crescer numa faixa de pH 4,0-9,8, com um pH ótimo entre 6-7. *S. aureus* sobrevive ao congelamento em carne em -18°C sobrevivendo durante pelo menos seis meses, sem qualquer alteração nas contagens de UFC. Por outro lado, uma temperatura superior a 46°C não é aceitável para a maioria das estirpes, com algumas exceções que crescem até 50°C. O aquecimento provoca danos para a célula. Enterotoxinas podem resistir tanto ao processo de pasteurização quanto ao de esterilização de leite e de alimentos enlatados, e não são afetados mesmo que por uma dose de esterilização de radiação (MEDVED'OVÁ & VALÍK, 2012; HUNT et al., 2012; FRANCO & LANDGRAF, 2008).

S. aureus é uma das principais causas de intoxicação alimentar. Ele produz muitas toxinas e pode facilitar o ataque de bactérias e a proliferação no organismo do hospedeiro. Algumas cepas podem produzir enterotoxinas estafilocócicas (SEs) que podem causar intoxicação alimentar, caso os alimentos ingeridos contenham a SE pré-formada (KHIABANI et al., 2014). Dentro de duas a seis horas após a ingestão de alimentos que contenham SEs, os pacientes apresentam sintomas de gastroenterite aguda, incluindo vômitos e diarreia violenta (JOHLER et al., 2015b). Os tipos de alimentos associados com intoxicação alimentar estafilocócica variam muito entre os países e incluem leite, creme, queijos, presunto, salsichas, saladas, cogumelos e refeições cozidas. O controle e redução de *S. aureus* em produtos lácteos não só evita perdas econômicas na fazenda como também melhora a segurança dos queijos produzidos a partir de leite cru (HUMMERJOHANN et al., 2014).

2.7.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli é muitas vezes considerado como um membro comensal da microbioma intestinal no homem e em animais, podendo causar infecções intestinais e extra-intestinais e é o agente mais comum de diarreia bacteriana em humanos e animais (BONYADIAN et al., 2014).

Os principais agentes de infecções intestinais são representados por membros da família Enterobacteriace. São capazes de fermentar a lactose com produção de gás, quando incubados a 35-37° C, por 48 horas. São bacilos gram-negativos e não formadores de esporos. Dentre esses, têm destaque fundamental as categorias diarreiogênicas de *Escherichia coli*. Elapode ser classificada por mecanismos de patogenicidade (toxinas, adesinas, invasibilidade), danos a animais de laboratório e padrões de adesão a células eucarióticas em cultura, e seus patótipos incluem: i) *E. coli* enteropatogênica (EPEC); ii) *E. coli* enteropatogênica atípica (A-EPEC); iii) *E. coli* enterotoxigênica (ETEC); iv) *E. coli* enterohemorrágica (EHEC); v) *E. coli* enteroinvasiva (EIEC); vi) *E. coli* de adesão difusa (DAEC); vii) *E. coli* enteroagregativa (EAEC) (SOUSA, 2006; FRANCO & LANDGRAF, 2008).

2.7.2 *Salmonella* spp.

O gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriace e compreendem bacilos gram-negativos, não produtores de esporos e anaeróbios facultativos. A maioria é móvel, através de flagelos. A temperatura ideal para multiplicação é 35-37°C, sendo a mínima de 5°C e a máxima 47°C. As salmoneloses caracterizam-se por sintomas que incluem diarreia, febre, dores abdominais e vômitos. Os sintomas aparecem, em média, 12 a 36 horas após o contato com o micro-organismo, durando entre um e quatro dias (FRANCO & LANDGRAF, 2008).

A ampla distribuição de *Salmonella* spp. entre os animais e sua capacidade de sobreviver por longos períodos no meio ambiente contribuem para seu destacado papel em saúde pública (BONA et al., 2010). Surtos de salmonelose têm sido associados com o consumo de leite cru e queijo. O isolamento de *Salmonellas* de alimentos pode ser difícil quando estão presentes em números baixos (D'AMICO et al., 2014).

O método de rotina para a detecção de *Salmonella* spp. envolve a utilização de um pré-enriquecimento não seletivo, o enriquecimento seletivo e subsequente a cultura em meios seletivos. A identificação é baseada nas provas bioquímica seguido por testes de serotipagem. Estes métodos são demorados e trabalhosos, muitas vezes levando até seis dias para um resultado positivo definitivo, e, portanto, não é uma solução rápida e eficaz para lidar com o ritmo de produção de alimentos atual e redes de distribuição, dessa forma, estratégias preventivas tais como Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), pode melhorar significativamente a segurança em toda a cadeia alimentar (RODRIGUEZ-LAZARO et al., 2014).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCAR, M. Y. A.; COSTA, D. A.; SOUZA, J. B. P.; ALENCAR, M. C. B.; CARMO, E. G. Investigação etnobotânica das plantas medicinais utilizadas para o tratamento de faringoamigdalite no CRAS de Cuité, PB. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**. v. 10, n.1, p. 170-177, 2015.

ALMEIDA, J. R. G. S.; SILVA, M. E. G. C.; GUIMARÃES, A. L.; OLIVEIRA, A. P.; ARAÚJO, C. S.; FILHO, J. A. S.; FONTANA, A. P.; DAMASCENO, P. K. F.; BRANCO, C. R. C.; BRANCO, A. HPLC-DAD analysis and antioxidant activity of *Hymenaea martiana* Hayne (Fabaceae). **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**. v. 4, n. 2, p. 1160-1166, 2012.

ASSIS, M. A.; MORELLI-AMARAL, V. FRANCISCO; PIMENTA, F. P. Grupos de pesquisa e sua produção científica sobre plantas medicinais: um estudo exploratório no Estado do Rio de Janeiro. **Revista Fitos**. v. 9, n. 1, p. 1-72, 2015.

BARROSO, G. M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa: Imprensa Universitária. 1991. 326p.

BATISTA, A. G.; ESTEVES, E. A.; DESSIMONI-PINTO, N. A. V.; OLIVEIRA, L. G.; PIRES, S. T.; SANTANA, R. C. Chemical composition of jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.) flour and its effect on growth of rats. **Alimentos e Nutrição**. v. 22, n. 2, p. 173-180, 2011.

BEZERRA, G. P. et al. Phytochemical study guided by the myorelaxant activity of the crude extract, fractions and constituent from stem bark of *Hymenaea courbaril* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, p. 62–69, 2013.

BONYADIAN, M.; MOSHTAGHI, H.; TAHERI, M. A. Molecular characterization and antibiotic resistance of enterotoxigenic and enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from raw milk and unpasteurized cheeses. **Veterinary Research Forum**. v. 5, n. 1, p. 29-34, 2014.

BONA, E. A. M.; PINTO, F. G. S.; BORGES, A. M. C.; WEBER, L. D.; FRUET, T. K.; ALVES, L. F. A.; MOURA, A. C. Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Erva-Mate (*Ilex paraguariensis*) sobre Sorovares de *Salmonella* spp. de Origem Avícola. **UNOPAR Científica, Ciências Biológicas e da Saúde**. v. 12, n. 3, p. 45-8, 2010.

BRASIL, Ministério da Saúde: Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução – RDC nº 10, de 09 de março, Brasília, 2010.**

CARDOSO, Z. Z. **A ligação histórica entre os Biomas Amazônia e Mata Atlântica através da Caatinga: Brejos de Altitude, 2011**. 18f. Trabalho de Conclusão do Curso de Licenciatura em Biologia - Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

CAVALCANTE, M. B. Ecoturismo no bioma Caatinga: o caso do Parque Estadual da Pedra da Boca, Paraíba. **Revista Nordestina de Ecoturismo**. v. 2, n. 1, p. 25-38, 2009.

CIPRIANO, J.; MARTINS, L.; DEUS, M. S. M.; PERON, A. N. O gênero *Hymenaea* e suas espécies mais importantes do ponto de vista econômico e medicinal para o Brasil. **Caderno de Pesquisa, Série Biologia**. v. 26. n. 2. p. 41-51, 2014.

COSTA, M. M.; SÁ, M. C. A.; PEIXOTO, R. M.; KREWER, C. C.; ALMEIDA, J. R. G. S.; VARGAS, A. C. Antimicrobial activity of caatinga biome ethanolic plant extracts against gram negative and positive bacteria. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**. v. 18, n2/3, p.62-66, 2011.

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

D'AMICO, D. J.; GROVES, E.; DONNELLY, C. W. Low Incidence of Foodborne Pathogens of Concern in Raw Milk Utilized for Farmstead Cheese Production. **Journal of Food Protection**. v. 71, n. 8, p. 1580–1589, 2008.

D'AMICO, D. J.; DRUART, M. J.; DONNELLY, C. W. Comparing the Behavior of Multidrug-Resistant and Pansusceptible *Salmonella* during the Production and Aging of a Gouda Cheese Manufactured from Raw Milk. **Journal of Food Protection**. v. 77, n. 6, p. 903–913, 2014.

D'AMICO, D. J.; DONNELLY, C. W. Microbiological quality of raw milk used for small-scale artisan cheese production in Vermont: Effect of farm characteristics and practices. **Journal of Dairy Science**. v. 93, n. 1, p. 134–147, 2010.

FIGUEIREDO, P. A. **Avaliação do potencial antioxidante, citotóxico e fotoprotetor de extratos de *Hymenaea courbaril* L. e *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne**. 2014. 70 f. Dissertação (Mestrado em Biociências). - Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Assis, 2014.

FIRMO, W. C. A.; MENEZES, V. J. M.; PASSOS, C. E. C.; DIAS, C. N. ALVES, L. P. L.; DIAS, I. C. L.; NETO, M. S.; OLEA, R. S. G. Contexto histórico, uso popular e concepção científica. **Caderno de Pesquisa**. v. 18, n. especial, 2011.

FRANCO, B. D. G. M. F; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: ed. Atheneu, 2008.

FUKA, M. M.; WALLISCH, S.; ENGEL, M.; WELZL, G.; HAVRANEK, J.; SCHLOTTER, M. Dynamics of Bacterial Communities during the Ripening Process of Different Croatian Cheese Types Derived from Raw Ewe's Milk Cheeses. **PLoS ONE**. v. 8, n. 11: e80734, 2013.

GIRALDI, M.; HANAZAKI, N. Uso e conhecimento tradicional de plantas medicinais no Sertão do Ribeirão, Florianópolis, SC, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**. v. 24, n. 2, p. 395-406, 2010.

GOVIND, P.; MADHURI, S. Some medicinal plants as natural anticancer agents. **Pharmacognosy Reviews**. v. 3, n. 6, p. 259-263, 2009.

HERRERO, M.; CASTRO-PUYANA, M.; MENDIOLA, J. A.; IBÁÑES, E. Compressed fluids for the bioactive compounds. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 43, p. 67-83, 2013.

HUMMERJOHANN, J.; NASKOVA, J.; BAUMGARTNER, A; GRABER, H. U. Enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* genotype B as a major contaminant in Swiss raw milk cheese. **Journal of Dairy Science**. v. 97, p. 1–8, 2014.

HUNT, K. SCHELIN, J.; RADSTROM, P.; BUTLER, F. JORDAN, K. Classical enterotoxins of coagulase-positive *Staphylococcus aureus* isolates from raw milk and products for raw milk cheese production in Ireland. **Dairy Science & Technology**. INRA and Springer. v. 92, n.5, p. 487-499, 2012.

ILDIS Legume Web. 2005. In: ILDIS – International Legume Database and Information Service, Version 10. Reading: University of Reading. *Hymenaea martiana* Hayne. Disponível em: <http://www.ildis.org/LegumeWeb?genus=Hymenaea&species=martiana>. Acesso em: 05/01/2015.

JOHLER, S.; GIANNINI, P.; JERMINI, M.; HUMMERJOHANN, J.; BAUMGARTNER, A.; STEPHAN, R. Further Evidence for Staphylococcal Food Poisoning Outbreaks Caused by egc-Encoded Enterotoxins. **Toxins**. v. 7, n. 3, p. 997-1004, 2015b.

JOHLER, S.; WEDER, D.; BRIDY, C.; HUQUENIN, MC.; ROBERT, L.; HUMMERJOHANN, J.; STEPHAN, R. Outbreak of staphylococcal food poisoning among children and staff at a Swiss boarding school due to soft cheese made from raw milk. **Journal of Dairy Science**. v. 98, n. 5, 2015a.

KHIABANI, Z. D.; SAADAT, Y. H, FOOLADI, A. A. I; SHAPOURIL, R.; HOSSEINI, M. M. Prevalence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in organic milk and cheese in Tabriz, Iran. **Iranian Journal of Microbiology**. v. 6, n. 5, p. 345-349, 2014.

KODAMA, M. T.; SARTORI, A. L. B. Caracterização morfológica de plântulas de *Hymenaea stigonocarpa* var. *stigonocarpa* Mart. Ex Hayne, *H. stigonocarpa* Hayne var. *brevipetiolata* N. Mattos e *H. courbaril* L. **Revista Brasileira de Biociências**. v. 5, supl.1, p. 663-665, 2007.

LEE, Y. T.; LANGENHEIM, J. H. **Systematics of the genus *Hymenaea* L. (Leguminosae, Caesalpinioideae, Detarieae)**. University of California Publications in Botany. v. 69, p. 1-109, 1975.

LORENZI, H.; SOUZA, V. C. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG**. São Paulo: Plantarum. 2005. 639p.

MALDANER, N. I. **Avaliação da qualidade microbiológica do leite cru produzido em duas propriedades do extremo oeste de Santa Catarina**. 2011, Monografia (Pós-graduação em nível de especialização em microbiologia industrial e de alimentos) Universidade do Oeste de Santa Catarina, UNOESC, 2011.

MARANHÃO, C. A. et al. Antitermitic and antioxidant activities of heartwood extracts and main flavonoids of *Hymenaea stigonocarpa* Mart. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 79, p. 9–13, 2013.

MEDVED'OVÁ, A.; VALÍK, L. *Staphylococcus aureus*: Characterisation and Quantitative Growth Description in Milk and Artisanal Raw Milk Cheese Production. **Structure and Function of Food Engineering**. INTECH open Science. Chapter 4, 2012.

MILIONI, C.; MARTÍNEZ, B. DEGL'INNOCENTI, S.; TURCHI, B.; FRATINI, F.; CERRI, D.; FISCHETTI, R. A novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LpU4 as a valuable candidate for biopreservation in artisanal raw milk cheese. **Dairy Science and Technology**. DOI 10.1007/s13594-015-0230-9, 2015.

MIRANDA, A. R.; CASTRO, C. F. S.; SILVÉRIO, M. D. O. Avaliação da atividade antioxidante e inibição da tirosinase do extrato das folhas do jatobá (*Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 16, n. 3, supl. I, p. 693-699, 2014.

NASCIMENTO, H. H. C.; NOGUEIRA, R. J. M. C.; SILVA, E. C.; SILVA, M. A. Análise do crescimento de mudas de jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) em diferentes níveis de água no solo. **Revista Árvore**, v. 35, n. 3, Edição Especial, p. 617-626, 2011.

OLIVEIRA, A. C. S. de. **Composição química e atividades antioxidante e anti-inflamatória da casca e entrecasca de *Capparis jacobinae* Moric. Ex Eichler**. Sergipe: UFS, 2015. 74p. (Dissertação – Mestrado em Biotecnologia).

OULAHAL, N.; BRICE, W.; MARTIAL, A.; DEGRAEVE, P. Quantitative analysis of survival of *Staphylococcus aureus* or *Listeria innocua* on two types of surfaces: Polypropylene and stainless steel in contact with three different dairy products. **Food Control**. v. 19, n. 2, p. 178-185, 2008.

PEDRIALI, C. A. **Síntese de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes**. 2005. 127f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

PENG, P.; TASARA, T.; HUMMERJOHANN, J.; STEPHAN, R. An overview of molecular stress response mechanisms in *E. coli* contributing to survival of stec during raw milk cheese production. **Journal of Food Protection**. v. 74, n. 5, p. 849–864, 2011.

PESTANA, L.T.C. **Estudo taxonômico de *Hymenaea* L.: complexo *H. courbaril*, *H. martiana* e *H. stigonocarpa* (Fabaceae: Caesalpinoidea: Detarieae)**. 2010, Dissertação (Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal – Mestrado) Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, UFMS, 2010.

PIMENTEL, R. B. Q.; COSTA, C. A.; ALBUQUERQUE, P. M.; JUNIOR, S. D. Antimicrobial activity and rutin identification of honey produced by the stingless bee *Melipona compressipes manausensis* and commercial honey. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. v. 13, p. 151, 2013.

PROBST, I. S. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico**. Dissertação (Mestrado em biologia geral e aplicada) – Universidade Estadual Paulista – UNESP, 112p., 2012.

RODRIGUEZ-LAZARO, D.; GONZALES-GARCÍA, P.; DELIBATO, E.; MEDICI, D.; GARCÍA-GIMENO, R. M.; VALERO, A.; HERNANDEZ, M. Next day *Salmonella* spp. detection method based on real-time PCR for meat, dairy and vegetable food products. **International Journal of Food Microbiology**. v. 184, p. 113-20, 2014.

SANTOS, K. K. A. **Atividade antiepipimastigota, citotóxica e fungicida de plantas medicinais da Região do Cariri**. Dissertação de mestrado. Universidade Regional do Cariri, 2011.

SILVA, M. R. R.; SOUZA, A. C. M.; KATO, L.; SILVA, C. C.; CIDADE, A. F.; OLIVEIRA, C. M. A. Antimicrobial activity of *Hymenaea martiana* towards dermatophytes and *Cryptococcus neoformans*. **Mycoses**. v. 53, n. 6, p. 500–503, 2009.

SILVA, R. R.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; PINTO, A. S.; ALBINO, F. T.; ALMEIDA, M. R.; MORAES, G. H. K.; PINTO, J. G. Efeito hipolipidêmico dos flavonóides naringina e rutina. **ALAN**. v. 51, n. 3, 2001.

SILVA, M.S.; LEITE, K.R.B.; SABA, M.D. Anatomia dos órgãos vegetativos de *Hymenaea martiana* Hayne (Caesalpinioideae-Fabaceae): espécie de uso medicinal em Caetité-BA. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. v. 14, n. 4, p. 673-679, 2012.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R.; OKAZAKI, M. M. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 4ª ed. São Paulo: Editora Varela, 2010.

SILVA, C. G.; MARINHO, M. G. V.; LUCENA, M. F. A.; COSTA, J. G. M. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais em área de Caatinga na comunidade do Sítio Nazaré, município de Milagres, Ceará, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. v. 17, n. 1, p. 133-142, 2015.

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

SOUZA, A. C. M. **Potencial antifúngico de extratos de *Hymenaea martiana***. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Goiás, 2008.

SOUZA, I. M.; FUNCH, L. S.; QUEIROZ, L. P. Morphological analyses suggest a new taxonomic circumscription for *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae, Caesalpinioideae). **PhytoKeys**. v. 38, p. 101– 118, 2014.

SPANU, V.; SCARANO, C.; COSSU, F.; PALA, C.; SPANU, C.; SANTIS, E. P. L. Antibiotic Resistance Traits and Molecular Subtyping of *Staphylococcus aureus* Isolated from Raw Sheep Milk Cheese. **Journal of Food Science**. v. 79, n. 10:M2066-71, 2014.

STESSL, B.; WALCHER, G.; GONANO, M.; KÜMMEL, J.; BARKER, G. C.; LEBL, K.; BEREUTER, O.; EHLING-SCHULZ, M.; WAGNER, M. *Staphylococcus aureus* reservoirs during traditional Austrian raw milk cheese production. **Journal of Dairy Research**. v. 81, n. 4, p. 1-9, 2014.

THE PLANT LIST: A Working List of All Plant Species. *Hymenaea martiana* Hayne. Disponível em: <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/ild-19779>. Acesso em: 05/01/2015.

USDA. *Hymenaea martiana* Hayne. Disponível em: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?436261>. Acesso em: 05/01/2015.

VAQUERO et al. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. **Food Control**. v. 18, p. 93–101, 2007.

VELASCO et al. Associação da Rutina com p-Metoxicinamato de Octila e Benzofenona-3: Avaliação In Vitro da Eficácia Fotoprotetora por Espectrofotometria de Refletância. **Latin American Journal of Pharmacy**. v. 27, n. 1, p. 23-27, 2008.

WINCK, C. A.; SCARTON, L. M.; SAGGIN, K. D.; MACHADO, J. A. D. Padrões de qualidade do leite cru no Brasil: Inserção mercadológica internacional ou exclusão social. In: VIII CONGRESSO LATINOAMERICANO DE SOCIOLOGIA RURAL, Porto de Galinhas, **Anais**. Porto de Galinhas: p. 1-18, 2010.

WELKER, C. A. D.; BOTH, J. M. C.; LONGARAY, S. M.; HAAS, S.; SOEIRO, M. L. T.; RAMOS, R. C. Análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**. v. 8, n. 1, p. 44-48, 2010.

4. ARTIGO 1: USO DO EXTRATO DE FOLHAS DO JATOBÁ (*Hymenaea martiana* Hayne) NA REDUÇÃO DAS CONTAGENS DE *Salmonella* spp., *Escherichia coli* E *Staphylococcus aureus* EM LEITE CRU.

Periódico a ser submetido: Food and Bioprocess Technology

SANTANA, T. C. de¹, COSTA, M. M. da², ALMEIDA J. R. G da S.³, ROLIM, L. A.⁴, FERNANDES, R. P. M.⁵

1 Programa de Pós-graduação em Agricultura e Biodiversidade da Universidade Federal de Sergipe, 49100-000, São Cristóvão, SE, Brasil.

2 Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da Universidade Federal do Vale do São Francisco, 56300-990, Petrolina, PE, Brasil.

3 Núcleo de Estudos e Pesquisas de Plantas Medicinais da Universidade Federal do Vale do São Francisco, 56304-205, Petrolina, PE, Brasil.

4 CAFMA – Central de Análise de Fármacos, Medicamentos e Alimentos da Universidade Federal do Vale do São Francisco, 56304-205, Petrolina, PE, Brasil.

5 Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de Sergipe, 49100-000, São Cristóvão, SE, Brasil.

1 Autor para correspondência: thiagoc.santana@hotmail.com

RESUMO

Hymenaea martiana Hayne, é uma espécie arbórea conhecida como “Jatobá” ou “Jatobá-da-mata”. Típica dos biomas cerrado e caatinga, as plantas do gênero *Hymenaea* são comumente utilizadas na medicina tradicional brasileira para o tratamento de processo inflamatório, infecções bacterianas, reumatismo e anemia. O grande potencial da biodiversidade brasileira estimula o desenvolvimento de produtos inovadores como os extratos vegetais, os quais têm sido recentemente estudados. Algumas plantas produzem em seu metabolismo secundário, substâncias com a capacidade de inibir a atividade de bactérias e outros micro-organismos. Um dos principais desafios da produção tradicional de alimentos é garantir a segurança dos alimentos. O Leite e produtos lácteos têm sido frequentemente implicados na intoxicação alimentar por *S. aureus*, *E. coli* e *Salmonella* spp. Dessa forma o objetivo desse estudo foi preparar o extrato de jatobá, identificar os compostos presentes e avaliar a atividade antimicrobiana. A partir da análise de CLAE-DAD, foi possível identificar a rutina como um dos compostos majoritários do extrato de folhas do jatobá e ela tem sido previamente identificada como uma das responsáveis pela atividade antibacteriana pelo seu efeito sinérgico junto às demais substâncias presentes nesse extrato. A concentração de rutina no extrato é de aproximadamente 106 µg/mg de extrato bruto. A partir do método de microdiluição foi possível obter as CBM do extrato. A concentração bacteriana mínima (CBM) do extrato etanólico das folhas de *H. martiana*, mostrou atividade antimicrobiana nas cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923, *Escherichia coli* ATCC® 35218 e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Choleraesuis* ATCC® 10708 que foi de 125,3 µg/mL, 781,2 µg/mL e 1.562,5 µg/mL respectivamente. Os testes microbianos in vivo mostrou que o extrato possui um poder bactericida nas cepas testadas na concentração de 10² UFC/mL. Diante dos dados obtidos, podemos então dizer que o extrato etanólico de *Hymenaea martiana* Hayne atuou como agente antimicrobiano, dentro dos padrões estabelecidos pelos órgãos de fiscalização e controle do leite cru, sendo uma alternativa para a redução da carga microbiana do leite, visando à produção de queijo coalho, diminuindo assim os casos de DTA's (Doenças Transmitidas por Alimentos) em derivados do leite.

Palavras-chave: Atividade antimicrobiana, CLAE-DAD, Laticínio e Rutina.

ABSTRACT**USE OF JATOBÁ (*Hymenaea martiana* Hayne) LEAVES EXTRACT IN REDUCTION OF *Salmonella* spp., *Escherichia coli* AND *Staphylococcus aureus* COUNTS IN RAW MILK****Periodic to be submitted: Food and Bioprocess Technology****SANTANA, T. C. de¹, COSTA, M. M. da², ALMEIDA J. R. G da S.³, ROLIM, L. A.⁴ and, FERNANDES, R. P. M.⁵**¹ Postgraduate Program in Agriculture and Biodiversity Federal University of Sergipe, 49100-000, São Cristóvão, SE, Brazil.² Animal Laboratory of Microbiology and Immunology at the Federal University of São Francisco Valley, 56300-990, Petrolina, PE, Brazil.³ Center for Research and Study of Medicinal Plants of the Federal University of São Francisco Valley, 56304-205, Petrolina, PE, Brazil⁴ CAFMA - Drugs Analysis Center, Food and Drug Administration, Federal University of São Francisco Valley, 56304-205, Petrolina, PE, Brazil.⁵ Department of Physiology at the Federal University of Sergipe, 49100-000, São Cristóvão, SE, Brazil.

1 Corresponding author: thiagoc.santana@hotmail.com

Hymenaea martiana Hayne, is an arboreal species known as "Jatobá" or "Jatobá-da-mata". Typical of the Cerrado and Caatinga biomes, the *Hymenaea* genus of plants are commonly used in traditional Brazilian medicine for the treatment of inflammation, bacterial infections, rheumatism and anemia. The savanna is the only exclusively Brazilian biome and much of its biological heritage can not be found anywhere else on the planet. The great potential of Brazilian biodiversity encourages the development of innovative products. Although the studies are still fresh plant extracts can be shown that some plants produce on its secondary metabolism, substances with the ability to inhibit the activity of bacteria and other micro-organisms. The *Hymenaea* genus is recognized as a source of phenolic compounds. Among the phenolic compounds are flavonoids include, as rutin, which are widely distributed in the leaves, seeds, bark and flowers of the plants. Rutin was identified in a honey sample with the highest antimicrobial activity. This flavonoid has previously been identified as responsible for the antibacterial activity of other plant extracts. It was found that the default routine has inhibitory activity against *S. aureus*, *E. coli* and *Salmonella* spp. One of the main challenges of traditional food production is to ensure food safety. Milk and dairy products have often been implicated in food poisoning by *S. aureus*, *E. coli* and *Salmonella* spp. Thus the aim of this study was to prepare the Jatobá extract, identify compounds and evaluate the antimicrobial activity. From the HPLC-DAD analysis, it was possible to identify the routine as one of the major compounds of jatobá leaves extract and it has previously been identified as one reason for the antibacterial activity by its synergistic effect with the other substances present in this extract. The concentration of rutin in the extract is approximately 106 µg/mg of crude extract. From the microdilution method it was possible to obtain the MBC extract. The minimum bacterial concentration (MBC) of the leaves ethanol extract of *Hymenaea martiana* Hayne, showed antimicrobial activity in strains of *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923, *Escherichia coli* ATCC® 35218 and *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Choleraesuis* ATCC® 10708 which was 125.3 µg/mL, 781.2 µg/mL and 1562.5 µg/mL respectively. Microbial testing in vivo showed that the extract has a bactericidal power in strains tested at concentrations of 10² CFU/mL. In our data, we can then say that the ethanol extract of *Hymenaea martiana* Hayne served as antimicrobial agent within the standards established by the organs of supervision and control of raw milk, being an alternative to reduce the microbial load of milk, aimed at producing curd cheese, thus reducing cases of DTF's (Diseases Transmitted by Food) in dairy products.

Keywords: Antimicrobial activity, HPLC-DAD, Dairy e Rutin.

4.1. Introdução

A caatinga é o único bioma exclusivamente brasileiro e grande parte do seu patrimônio biológico não pode ser encontrado em nenhum outro lugar do planeta (CAVALCANTE, 2009). O grande potencial da biodiversidade brasileira estimula o desenvolvimento de produtos inovadores, como produtos químicos, medicamentos e alimentos (ASSIS et al., 2015). *Hymenaea martiana* Hayne, é uma espécie arbórea conhecida como “Jatobá” ou “Jatobá-da-mata” (CIPRIANO et al., 2014; ALMEIDA et al., 2012). É uma espécie do gênero *Hymenaea*, pertencente à família: Fabaceae (alt. Leguminosae), subfamília: Caesalpinioideae e tribo: Detarieae (THE PLANT LIST, 2015; USDA, 2015; ILDIS, 2015). Típica dos biomas cerrado e caatinga (SILVA et al., 2012), as plantas do gênero *Hymenaea* são comumente utilizadas na medicina tradicional brasileira para o tratamento de processo inflamatório, infecções bacterianas, reumatismo e anemia (SILVA, 2009).

Embora os estudos com extratos vegetais ainda sejam recentes, já pôde ser evidenciado que algumas plantas produzem em seu metabolismo secundário, substâncias com a capacidade de inibir bactérias e outros micro-organismos (SOUZA, 2010). Um dos maiores desafios na determinação do efeito farmacológico de um extrato tem sido a elucidação de seus compostos ativos. As plantas contêm inúmeros constituintes em seus extratos. Quando testados, podem apresentar efeitos sinérgicos ou antagônicos e isso se deve a presença de diferentes compostos (SERPELONI, 2008). A avaliação do potencial antimicrobiano de substâncias presentes em extratos tem sido objeto de incessantes estudos. Os compostos fenólicos, alcalóides e flavonóides e os terpenos são ativos contra vírus, bactérias e fungos (SOUZA, 2010).

O gênero *Hymenaea* é reconhecido como fonte de compostos fenólicos (MIRANDA, 2014). Dentre os compostos fenólicos destacam-se os flavonoides, como a Rutina, que estão amplamente distribuídos nas folhas, sementes, cascas e flores das plantas (HEIM et al., 2002). Este flavonoide tem sido previamente identificado como o responsável pela atividade antibacteriana de outros extratos vegetais. Verificou-se que o padrão rutina apresenta atividade inibitória contra *S. aureus*, *E. coli* e *Salmonella* spp. (PIMENTEL et al., 2013).

Um dos principais desafios da produção tradicional de alimentos é garantir a segurança dos alimentos (MILIONI et al., 2015). O leite e produtos lácteos têm sido frequentemente implicados na intoxicação alimentar por *S. aureus*, (KHIABANI et al., 2014) *E. coli* e *Salmonella* spp. A utilização de leite cru para a produção de queijo tradicional pode ser entendido como uma prática de alto risco (D'AMICO et al., 2008). O consumo de leite cru e queijo produzido a partir de leite cru constitui um risco para a saúde, em particular quando as crianças ou membros de outras populações sensíveis estão envolvidos (JOHLER et al., 2015). Problemas de saúde pública associados ao consumo de leite não pasteurizado e produtos de leite cru são bem documentados (PENG et al., 2011). Bactérias patogênicas que podem ser transmitidas por produtos lácteos não podem ser subestimadas. Historicamente, houveram vários surtos relacionados com o consumo de queijos. Os organismos responsáveis predominantemente relatados são *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus*. (MEDVED'OVÁ & VALÍK, 2012; HUNT et al., 2012).

O objetivo desse trabalho é reduzir as contagens a níveis aceitáveis de *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* com o extrato de folhas do jatobá (*Hymenaea martiana* Hayne) visando a produção de queijo coalho com leite cru.

4.2. Material e Métodos

4.2.1. Coleta do Material Vegetal

A coleta das folhas da árvore *Hymenaea martiana* Hayne ocorreu nas margens do rio São Francisco, localizado na Vila Caatinginha, cidade de Petrolina-PE, 25 km do centro da cidade, nas coordenadas: 09°27'24.6"S 040°40'54.3"W, 342 metros; 09°27'25.1"S 040°40'52.6"W, 377 metros; 09°27'25.4"S 040°40'51.6"W, 376 metros. A coleta foi realizada no mês de dezembro e a exsicata foi depositada no herbário da EMBRAPA SEMIÁRIDO com o número de tombamento: HTSA 6149. Coletor e nº: A.P. Fontana 8922, T.C. Santana e L. A. da Silva. Foram escolhidos de forma aleatória 10 indivíduos de uma mesma população e coletados folhas jovens de cada árvore, com o auxílio do podão.

As folhas foram submetidas à secagem em estufa de circulação de ar forçada a 50°C por 72 horas até completa desidratação. Após desidratadas, as folhas foram reduzidas a pó utilizando um moinho de facas, e em seguida armazenadas em sacos de papel até o momento da extração.

4.2.2. Preparação do extrato etanólico

O pó das folhas de *H. martiana* foi submetido à extração repetidamente por três vezes a 72 horas com etanol a 95% a 25°C. A solução extrativa foi concentrada a vácuo, obtendo-se após a destilação do solvente aproximadamente 1 Kg do extrato bruto etanólico (ALMEIDA et al., 2012).

4.2.3. Análise por CLAE-DAD de Rutina

O método analítico foi desenvolvido por CLAE - DAD, em equipamento Shimadzu® equipado com um sistema quaternário de bombas modelo LC - 20ADVP, degaseificador modelo DGU - 20A, detector PDA modelo SPD - 20AVP, forno modelo CTO - 20ASVP, injetor automático modelo SIL - 20ADVP e controlador modelo SCL - 20AVP, e os dados foram analisados através do software Shimadzu® LC solution 1.0 (Japão).

Os solventes utilizados na cromatografia líquida de alto desempenho foram de grau cromatográfico da J.T.Barker®. O desmineralizador de água MOD. 670Fisatom® foi utilizado para desmineralizar a água e posteriormente foi utilizado o ultrapurificador da Heal Force®, modelo Smart Series para a obtenção da água ultrapurificada.

O extrato (250 µg/mL) foi analisado em uma coluna de fase reversa: Ascentis®C18 (250 mm x 4,6 mm DI, 5 µm) marca Sulpelco®. A fase móvel era composta de solvente (A) H₂O/C₂HF₃O₂ a 0,01% e solvente (B) Acetonitrila. O gradiente de solvente foi composto de A (100-60%) e B (0-40%) durante 40 min, em seguida manteve-se a concentração de 60% de A e 40% de B, durante 10 min. depois retorna para a condições iniciais, (100% de A e 0% B) durante 10 min. Uma taxa de fluxo de 1,0 mL/min foi usada em um forno de 37°C, e 40 µL de cada amostra foi injetada em triplicata. As amostras foram filtradas através de um filtro 0,20 µm CHROMAFIL®Xtra PVDF-20/25 antes da injeção. Os dados espectrofotométricos foram registrados entre 200 a 400 nm, durante toda a execução, com cromatogramas registrados em 350 nm (ALMEIDA et al., 2012).

Para análise quantitativa foi utilizado um padrão analítico de Rutina (Sigma Aldrich®, com pureza superior a 99%) nas concentrações de 1,44 a 2,16 µg/mL, conforme Figura 2.

4.2.4. Método de microdiluição

Realizou-se a pesagem de 0,25g do extrato que foi novamente diluído em 10 mL de etanol, obtendo-se uma solução estoque na concentração de 25 mg/mL. A determinação da Concentração Bacteriana Mínima (CBM) foi realizada pela adição de 200µL de caldo Muller-

Hinton em placas de microtitulação; a seguir, 200µL da solução estoque do extrato foram acrescidos ao primeiro poço e, após homogeneização, foi transferido 200µL para o segundo e assim sucessivamente, sendo obtidas as seguintes concentrações finais: 12.500; 6.250; 3.125; 1.562,5; 781,2; 390,6; 195,3 e 97,6 µg/mL.

Na preparação do inóculo, colônias obtidas em Ágar MH (Muller-Hinton), foram utilizadas na obtenção de uma suspensão bacteriana com turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de MacFarland (ou 10^8 UFC/mL), obtidas de colônias frescas de bactérias. *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 35218, *Salmonella* ssp. ATCC 10708 foram às cepas de bactérias testadas. Cada cepa foi inoculada em nove mL de solução fisiológica de modo a se obter uma concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (0,5 MacFarland). Desta suspensão foi inoculado 10µL nos poços de microplacas contendo a diluição do extrato etanólico. O material foi incubado a 37°C por 24h, em condições de aerobiose. Determinou-se a concentração inibitória mínima (MIC) que corresponde a menor concentração do extrato capaz de causar inibição do crescimento bacteriano. Para a determinação da concentração bactericida mínima (CBM), foi retirada uma alíquota de 10µL, semeando-se na superfície do ágar MH e incubou-se a 35°C por 48 horas. Foi determinada a concentração bactericida mínima, a menor concentração do extrato etanólico capaz de causar a morte do inóculo. Todos os ensaios foram realizados em triplicata (CLSI, 2012).

4.2.5. Contaminação do leite

Foram utilizadas três concentrações de *S. aureus*, *E. coli* e *Salmonella* ssp.: 10^2 , 10^4 , 10^8 , determinadas através de espectrofotometria. Cada concentração foi utilizada para contaminar uma caixa leite UHT de 1 L, tornando-se a amostra a ser analisada. Foram realizados também os controles positivo e negativo, branco do meio de cultura e branco do leite UHT. As análises foram realizadas nos tempos 0, 12 e 24 horas.

4.2.6. Análise de *S. aureus*

Em placas de Ágar Baird-Parker (BP), para cada concentração, foram inoculadas em quatro placas de petri, com os seguintes volumes cada: 0,3 mL, 0,3 mL, 0,3 mL e 0,1 mL. Os inóculos foram espalhados com auxílio de uma alça de Drigalski até a absorção total do líquido, incubadas invertidas a 35-37°C/45-48 horas. Após incubação dos cultivos em aerobiose, nas placas com 20 a 200 colônias, foram contadas as típicas de *S. aureus* (colônias circulares, pretas ou cinzas escuras, pequenas, lisas, convexas, bordas perfeitas, com halo transparente), dessas, cinco foram selecionadas para o teste da coagulase em tubos. Para realização desta prova, em bancada devidamente sanitizada, selecionou-se cinco colônias e com o auxílio de alça de platina cada colônia foi inoculada em tubos contendo cinco mL da cultura em Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI). Os tubos foram incubados em estufas a 35-37°C, por 18-24 horas.

Para a prova de coagulase, após a incubação, transferiu-se 0,2 mL de cada tubo de cultivo em BHI para tubos estéreis, contendo 0,5 mL de Coagulase Plasma-EDTA (plasma de coelho com EDTA). Incubou-se a 35-37°C por 6 horas.

Para a prova de Catalase, com o auxílio de alça de platina, bastão de vidro ou pipeta de Paster, estéreis, retirou-se uma alíquota do cultivo em ágar estoque e transferiu-se para uma lâmina ou placa de vidro contendo uma gota e peróxido de hidrogênio a 3%. Misturou-se o inóculo ao peróxido e observou a reação. A não formação de borbulhas indicada prova negativa para catalase. *Staphylococcus aureus* é a catalase positiva.

O resultado final foi determinado pela soma dos resultados de colônias típicas e atípicas confirmadas. O resultado foi expresso em: Contagem de *S. aureus*: $X \times 10^Y$ UFC/g ou mL. Contagem de *S. aureus* coagulase positiva: $X \times 10^Y$ UFC/g ou mL. (MAPA, 1993; SIQUEIRA, 1995; SILVA, 2010).

4.2.7. Análise de *E. coli*

Transferiu-se de cada diluição, alíquotas de um mL para placas de Petri esterilizadas. Verteu-se de 15 a 20 mL do ágar VRB, recém-preparado, a uma temperatura de 45°C, nas placas inoculadas. Foi homogeneizado com movimentos em oito e posteriormente esperou-se a solidificação do meio. Adicionou-se mais uma camada de ágar VRB (3 a 5 mL) sobre o meio solidificado. Após a solidificação total, incubou-se as placas em posição invertida a 32±1°C por 24±2 horas.

Contaram-se todas as colônias vermelho púrpura, com 0,5mm ou mais em diâmetro, rodeadas por um halo avermelhado de precipitação de sais biliares. Para avaliação do teste foram utilizadas placas com 15 a 150 colônias e determinado o número de UFC/g ou mL multiplicando o número de colônias típicas pelo inverso da diluição. (MAPA, 1993; SIQUEIRA, 1995; SILVA, 2010).

4.2.8. Análise de *Salmonella* spp.

As amostras foram incubadas na estufa bacteriológica a 35°C ± 2°C por 18-24 ± 3 horas para o pré-enriquecimento.

Após o período de incubação do pré-enriquecimento, a amostra foi retirada da estufa e encaminhada para o fluxo laminar previamente sanitizado e estéril. Transferiu-se simultaneamente, com auxílio de uma pipeta automática de 5 ou 10 mL, alíquotas de 0,1mL da amostra para tubos contendo 10 mL de caldo Rappaport Vassiliadis e 1 mL para 10 mL de caldo Selenito Cistina (caldos de enriquecimento seletivo - meios líquidos). Incubou-se o suporte com caldo Rappaport Vassiliadis na estufa bacteriológica a 42°C ± 0,2°C por 24 ± 2 horas e o caldo Selenito Cistina na estufa bacteriológica a 43°C ± 0,2°C por 24 ± 2 horas.

Após o período de incubação retirou-se da estufa o suporte com os tubos de ensaio dos caldos de enriquecimento seletivo e o encaminhamos para a capela de fluxo laminar previamente sanitizada/estéril. Semeou-se com auxílio de alça de platina de caldo selenito cistina para placas contendo BG e SS e do meio rappaport vassiliadis também para placas contendo meio BG e SS. Incubaram-se todas as placas na estufa, a 37°C ± 1°C por 24 ± 3 horas.

Transcorrido o período de incubação do plaquamento seletivo, foram retiradas as placas contendo BG e SS, da estufa e foram levadas para a bancada previamente sanitizada da sala de repique. Caso haja crescimento, seleciona-se de três a cinco colônias típicas (suspeitas) por amostra de *Salmonella* spp. levando-se em conta as seguintes características para cada meio: No meio ágar BG as colônias apresentam-se de vermelho a rosadas com halo vermelho. No meio ágar SS, as colônias apresentam-se com a mesma cor do meio, transparentes e às vezes com centro negro.

Após realização das análises das características das colônias típicas suspeitas de *Salmonella* spp., transferiu-se com auxílio de alça de platina 3 a 5 colônias suspeitas de *Salmonella* spp. fazendo estrias, no bisel e inocular em profundidade nos meios ágar TSI e LIA, incubando os tubos em estufa a 35°C ± 2°C por 24 horas ± 2 horas. Para as provas bioquímicas complementares com as culturas suspeitas de *Salmonella* spp., proceder às inoculações nos seguintes meios: caldo malonato, caldo KCN, caldo vermelho de metila-Voges-Proskauer, caldo indol, agar citrato SIMMONS, ágar fenilalanina, ágar lisina-descarboxilase, caldo carboidrato (glicose, lactose e dulcitol), vermelho difenol, meio sim, meio ágar gelatina e caldo uréia. Incubando os tubos em estufa a 35°C ± 2°C por 48 horas ± 2 horas.

Para expressão dos resultados: Presença/25g ou mL de *Salmonella*; Ausência/25g ou mL de *Salmonella* (MAPA, 1993; SIQUEIRA, 1995; SILVA, 2010).

4.3. Resultados e discussão

4.3.1. Obtenção do Extrato Bruto

Foi obtido 1 kg de extrato bruto etanólico a partir dos 5 kg das folhas de *Hymenaea martiana* Hayne, obtendo-se um rendimento médio de 20% desse extrato.

4.3.2. Análise Cromatográfica em CLAE-DAD

A partir da análise cromatográfica do extrato de *H. martiana* (250µg/mL) foi possível identificar a presença de compostos fenólicos, dentre esses compostos foi identificada e quantificada a partir de padrão analítico a Rutina, por meio da semelhança entre tempos de retenção ($28,55 \pm 1,3$ min.) e espectros de absorção no ultravioleta ($\lambda_{\text{Máx.}}$ 255,74 e 353,44), conforme pode ser observado nas Figuras 1 e 2.

A curva analítica obtida está demonstrada na Figura 2, em que se pode observar um coeficiente de concentração linear 0,98. A partir desses resultados foi possível calcular a quantidade de Rutina presente no extrato sendo observado $106,25 \pm 10,84$ µg de rutina/mg de extrato. Em 200 µL de extrato a quantidade de rutina é 531,35 µg. Devido à semelhança no perfil de absorção no UV, podemos sugerir que outros picos majoritários que não foram possíveis identificar, faça parte do mesmo grupo biológico: flavonoides, corroborando com ALMEIDA et al (2012) que relata a presença desses compostos após análise cromatográfica de folhas de *H. martiana*.

Atividade antimicrobiana frente a patógenos gram positivos de extrato de própolis contendo rutina já foi descrito por BARRIENTOS et al. (2013).

4.3.3. Método de microdiluição

A partir da metodologia de microdiluição, foi possível obter a Concentração Bactericida Mínima (CBM) de cada cepa testada. As cepas obtiveram as seguintes CBM's: *S. aureus* ATCC® 25923 ($125,3$ µg/mL), *E. coli* ATCC® 35218 ($781,2$ µg/mL) e *S. enterica* subsp. *enterica* serovar *Choleraesuis* ATCC® 10708 ($1.562,5$ µg/mL). De acordo com os resultados *in vitro*, o extrato conseguiu em baixas concentrações obter um potencial antimicrobiano adequado. Em testes realizados por MOURA (2013), em material vegetal de *H. martiana*, a CBM de *S. aureus* foi entre 12.500 - $195,3$ µg/mL e a CBM de *Salmonella* spp. foi de 12.500 - 6.250 µg/mL. Nos isolados de *E. coli* não foi verificado efeito antimicrobiano. Várias plantas do gênero *Hymenaea* apresentam importantes atividades antimicrobianas, especialmente sobre patógenos gram positivos (DIMECH et al., 2013; PEIXOTO et al., 2015).

4.3.4. Análise Microbiológica

Por apresentar atividade antimicrobiana, o extrato etanólico de *H. martiana* foi utilizado no leite cru contaminado. Baseado nos resultados da CBM *in vitro*, era esperado que o extrato etanólico de *H. martiana* fosse eliminar o crescimento bacteriano das cepas testadas *in vivo*, visto que a concentração do extrato utilizada nas amostras eram superiores aos resultados da CBM. Porém, após a realização dos ensaios microbiológicos realizados no leite UHT, contaminado com as concentrações: 10^2 , 10^4 , 10^8 , foi possível observar que somente a concentração 10^2 , apresentou atividade antimicrobiana frente às cepas de *S. aureus*, *E. coli* e *Salmonella* spp. nos tempos 0, 12 e 24 horas. Vários fatores estão relacionados aos resultados *in vivo* obtidos, dentre eles está à interação do extrato com o leite UHT, já que os compostos biológicos do leite podem ter reagido com os compostos bioativos do extrato, reduzindo o seu potencial bacteriostático, já que o leite é um agente complexante. KASSAIF et al. (2007) ao avaliarem a sensibilidade de diferentes desinfetantes em propriedades leiteiras verificaram que muitos destes compostos podem ser inibidos pela presença do leite. O mesmo foi descrito para

extrato vegetal frente a isolados de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (HAMMER et al., 1999). Outro fator a ser analisado é a interação das cepas com o meio biologicamente rico em nutrientes do leite UHT, que pode potencializar a capacidade de multiplicação das mesmas. Vale salientar que as amostras foram deixadas a temperatura ambiente durante o tempo 0, 12 e 24 horas.

A Tabela 1 apresenta a dinâmica de crescimento bacteriano no leite após a aplicação do extrato de *H. martiana*. A cepa de *S. aureus* na concentração 10^4 foi inibida nos tempos 0, 12 e 24 horas, enquanto que na concentração 10^8 , houve o crescimento no tempo zero de 46 UFC/mL e nos tempos 12 e 24 horas de incontáveis colônias.

Em relação a *E. coli*, a concentração 10^4 apresentou atividade antimicrobiana no tempo zero, sendo que no tempo de 12 horas houve o crescimento de 8 UFC/mL. No tempo 24 horas, o resultado foi incontável. Na concentração 10^8 houve o crescimento de $1,3 \times 10^2$ UFC/mL no tempo zero e nos tempos 12 e 24 horas não foi possível contar o número de colônias presentes nas placas.

Em relação à cepa de referência de *Salmonella* spp. tanto nas com concentrações 10^4 e 10^8 , nos tempos 0, 12 e 24 horas houve a presença do patógeno, conforme a Tabela 1.

Na amostra de leite utilizada como controle não se verificou o crescimento bacteriano, comprovando assim que o mesmo estava inócuo. Os controles positivos e negativos dos meios de cultura apresentaram os resultados esperados, comprovando que os mesmos estavam aptos para a realização dos ensaios microbiológicos.

A presença de *S. aureus*, *E. coli* e *Salmonella* spp. em leite cru é muito comum e está relacionada a grandes surtos de intoxicação alimentar associados a derivados lácteos como o queijo (GOUOLD et al., 2014). Muitas vezes não somente a presença de bactérias, como a de suas toxinas é associadas às enfermidades (ONO et al., 2015). Em particular para *S. aureus* contagens superiores a 10^6 UFC/mL são associadas à produção de toxinas termoestáveis, que podem contaminar o leite e ocasionar enfermidade, mesmo após o tratamento térmico (SCHELIN et al., 2011). Desta forma, o uso de estratégias que minimizem a multiplicação destes micro-organismos são muito importante. O efeito antimicrobiano observado no leite in natura é muito importante, pois pode servir a este fim. Mesmo sem uma redução total, a diminuição nas contagens bacterianas pode garantir uma maior segurança alimentar para os produtos lácteos. Contudo em relação à *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. o efeito descrito no presente estudo não é significativo, uma vez que estes patógenos devem ser completamente eliminados (MAPA, 1993).

Diante dos dados obtidos, podemos então dizer que o extrato etanólico de *H. martiana* atuou como agente antimicrobiano e possui uma ação mais ativa sobre os micro-organismos gram positivos, já que de acordo com QUINN et al. (2005) esta resistência pode estar associada à presença de uma barreira de permeabilidade na membrana exterior de bactérias gram-negativas, que limita o acesso dos agentes antimicrobianos, sendo estas tipicamente mais resistentes a agentes antimicrobianos do que as gram-positivas. Segundo DIMECH et al. (2013) alterações na parede celular de *Staphylococcus aureus* foram evidenciadas após a incubação com extrato hidroalcolico de *H. stigonocarpa*.

Pode-se afirmar também que dentro dos padrões estabelecidos pelos órgãos de fiscalização e controle do leite cru o mesmo teve uma atividade antimicrobiana significativa, sendo uma alternativa para a redução da carga microbiana do leite visando à produção de queijo coalho, diminuindo assim os casos de DTA's (Doenças Transmitidas por Alimentos) em derivados do leite.

4.4 Conclusão

O extrato de *H. martiana* apresenta atividade antimicrobiana frente às cepas de *S. aureus*, *E. coli* e *Salmonella* spp. Esses resultados abrem perspectivas para utilização de um produto natural de baixo custo à base de Jatobá como alternativa medicinal contra patógenos humanos. Portanto, podemos sugerir o uso do extrato de Jatobá como alternativa para a redução das contagens do leite cru visando à produção de queijo coalho.

4.5. Referências

- ALMEIDA, J. R. G. S.; SILVA, M. E. G. C.; GUIMARÃES, A. L.; OLIVEIRA, A. P.; ARAÚJO, C. S.; FILHO, J. A. S.; FONTANA, A. P.; DAMASCENO, P. K. F.; BRANCO, C. R. C.; BRANCO, A. HPLC-DAD analysis and antioxidant activity of *Hymenaea martiana* Hayne (Fabaceae). **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**. v. 4, n. 2, p. 1160-1166, 2012.
- ASSIS, M. A.; MORELLI-AMARAL, V. FRANCISCO; PIMENTA, F. P. Grupos de pesquisa e sua produção científica sobre plantas medicinais: um estudo exploratório no Estado do Rio de Janeiro. **Revista Fitos**. v. 9, n. 1, p. 1-72, 2015.
- BARRIENTOS, L.; HERRERA, C. L.; MONTENEGRO, G.; ORTEGA, X.; VELOZ, J.; ALVEAR, M.; CUEVAS, A.; SAAVEDRA, N.; SALAZAR, L. A. Chemical and botanical characterization of Chilean propolis and biological activity on cariogenic bacteria *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 44, n. 2, p. 577-585, 2013.
- CAVALCANTE, M. B. Ecoturismo no bioma Caatinga: o caso do Parque Estadual da Pedra da Boca, Paraíba. **Revista Nordestina de Ecoturismo**. v. 2, n. 1, p. 25-38, 2009.
- CIPRIANO, J.; MARTINS, L.; DEUS, M. S. M.; PERON, A. N. O gênero *Hymenaea* e suas espécies mais importantes do ponto de vista econômico e medicinal para o Brasil. **Caderno de Pesquisa, Série Biologia**. v. 26, n. 2, p. 41-51, 2014.
- CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition. **CLSI document M07-A9**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. v. 32, n. 2, 2012.
- D'AMICO, D. J.; GROVES, E.; DONNELLY, C. W. Low Incidence of Foodborne Pathogens of Concern in Raw Milk Utilized for Farmstead Cheese Production. **Journal of Food Protection**. v. 71, n. 8, p. 1580–1589, 2008.
- DIMECH, G. S.; SOARES, L. A. L.; FERREIRA, M. A.; OLIVEIRA, A. G. V.; CARVALHO, M. C.; XIMENES, E. A. Phytochemical and Antibacterial Investigations of the Extracts and Fractions from the Stem Bark of *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne and Effect on Ultrastructure of *Staphylococcus aureus* Induced by Hydroalcoholic Extract. **The ScientificWorld Journal**. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/862763>, 2013.
- GOULD, L. H.; MUNGAI, E.; BEHRAVESH, C. B. Outbreaks Attributed to Cheese: Differences Between Outbreaks Caused by Unpasteurized and Pasteurized Dairy Products, United States, 1998–2011. *Foodborne Pathogens and Disease*. v. 11, n. 7, p. 545-51, 2014.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*. v. 86, p. 985–990, 1999.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **The Journal of nutritional biochemistry**. v. 13, p. 572–584, 2002.

HUNT, K. SCHELIN, J.; RADSTROM, P.; BUTLER, F. JORDAN, K. Classical enterotoxins of coagulase-positive *Staphylococcus aureus* isolates from raw milk and products for raw milk cheese production in Ireland. **Dairy Science & Technology**. INRA and Springer. v. 92, n. 5, p. 487-499, 2012.

ILDIS Legume Web. 2005. In: ILDIS – International Legume Database and Information Service, Version 10. Reading: University of Reading. *Hymenaea martiana* Hayne. Disponível em: <http://www.ildis.org/LegumeWeb?genus=Hymenaea&species=martiana>. Acesso em: 05/01/2015.

JOHLER, S.; WEDER, D.; BRIDY, C.; HUQUENIN, MC.; ROBERT, L.; HUMMERJOHANN, J.; STEPHAN, R. Outbreak of staphylococcal food poisoning among children and staff at a Swiss boarding school due to soft cheese made from raw milk. **Journal of Dairy Science**. v. 98, n. 5, 2015.

KASSAIFY, Z. G.; HAKIM, R. G. E.; RAYYA, E. G.; SHAIB, H. A.; BARBOUR, E. K. Preliminary study on the efficacy and safety of eight individual and blended disinfectants against poultry and dairy indicator organisms. **Veterinaria Italiana**. v. 43, n. 4, p. 821-830, 2007.

KHIABANI, Z. D.; SAADAT, Y. H, FOOLADI, A. A. I; SHAPOURIL, R.; HOSSEINI, M. M. Prevalence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in organic milk and cheese in Tabriz, Iran. **Iranian Journal of Microbiology**. v. 6, n. 5, p. 345-349, 2014.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **PORTARIA Nº 101, DE 11 DE AGOSTO DE 1993**.

MEDVED'OVÁ, A.; VALÍK, L. *Staphylococcus aureus*: Characterisation and Quantitative Growth Description in Milk and Artisanal Raw Milk Cheese Production. Structure and Function of Food Engineering. **INTECH open Science**. Chapter 4, 2012.

MILIONI, C.; MARTÍNEZ, B. DEGL'INNOCENTI, S.; TURCHI, B.; FRATINI, F.; CERRI, D.; FISCHETTI, R. A novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LpU4 as a valuable candidate for biopreservation in artesanal raw milk cheese. **Dairy Science and Technology**. doi 10.1007/s13594-015-0230-9, 2015.

MIRANDA, A. R.; CASTRO, C. F. S.; SILVÉRIO, M. D. O. Avaliação da atividade antioxidante e inibição da tirosinase do extrato das folhas do jatobá (*Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 16, n. 3, supl. I, p. 693-699, 2014.

MOURA, F. M . L.; BAPTISTA, R. I. A. A.; SANTOS, V. V. M.; MOURA, A. P. B. L.; COSTA, M. M. Utilização de plantas do bioma Caatinga no controle de patógenos de interesse na área de alimentos – uma revisão. **Acta Veterinaria Brasilica**. v. 7, n. 2, p. 125-136, 2013.

ONO, H. K.; SATO'O, Y.; NARITA, K.; NAITO, I.; HIROSE, S.; HISATSUNE, J.; ASANO, K.; HU D-L.; OMOE, K.; SUGAI, M.; NAKANE, A. Identification and Characterization of a Novel Staphylococcal Emetic Toxin. *Applied and Environmental Microbiology*. doi:10.1128/AEM.01873-15, 2015.

PEIXOTO, R. M.; ARAÚJO, R. M. P. PEIXOTO, L. J. S.; BOMFIM, S. A. G.; SILVA, T. M. G.; SILVA, T. M. S.; ALMEIDA, J. R. G. S.; MOTA, R. A.; COSTA, M. M. Treatment of goat mastitis experimentally induced by *Staphylococcus aureus* using a formulation containing *Hymenaea martiana* extract. **Small Ruminant Research**. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.07.009>, 2015

PENG, P.; TASARA, T.; HUMMERJOHANN, J.; STEPHAN, R. An overview of molecular stress response mechanisms in e coli contributing to survival of stec during raw milk cheese production. **Journal of Food Protection**. v. 74, n. 5, p. 849–864, 2011.

PIMENTEL, R. B. Q.; COSTA, C. A.; ALBUQUERQUE, P. M.; JUNIOR, S. D. Antimicrobial activity and rutin identification of honey produced by the stingless bee *Melipona compressipes manausensis* and commercial honey. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. v. 13, p. 151, 2013.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K., CARTER, M.E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. Cap. 6, p. 42-49.

SCHELIN, J.; WALLIN-CARLQUIST, N.; COHN, M. T.; LINDQVIST, R.; BARKER, G. C.; RADSTRÖM, P. The formation of *Staphylococcus aureus* enterotoxin in food environments and advances in risk assessment. **Virulence**. v. 2, n. 6, p. 580-592, 2011.

SERPELONI, J. M.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A.; CÓLUS, I. M. S. In vivo evaluation of anticlastogenicity of extracts from medicinal plants of *Miconia* genus using the micronucleus test. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**. v. 29, n. 1, p. 47-56, 2008.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R.; OKAZAKI, M. M. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 4ª ed. São Paulo: Editora Varela, 2010.

SILVA, M. R. R.; SOUZA, A. C. M.; KATO, L., SILVA, C. C.; CIDADE, A. F.; OLIVEIRA, C. M. A. Antimicrobial activity of *Hymenaea martiana* towards dermatophytes and *Cryptococcus neoformans*. **Mycoses**. v. 53, n. 6, p. 500–503, 2009.

SILVA, M.S.; LEITE, K.R.B.; SABA, M.D. Anatomia dos órgãos vegetativos de *Hymenaea martiana* Hayne (Caesalpinioideae-Fabaceae): espécie de uso medicinal em Caetité-BA. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 14, n. 4, p. 673-679, 2012.

SIQUEIRA, R. S. **Manual de Microbiologia de Alimentos**. EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa e Tecnologia Agroindustrial de Alimentos (Rio de Janeiro - RJ). Brasília: EMPRAPA-SPI; 1995.

SOUZA, A. C. M.; KATO, L.; SILVA, C. C.; CIDADE, A. F. OLIVEIRA, C. M. A.; SILVA, M. R. R. Antimicrobial activity of *Hymenaea martiana* towards dermatophytes and *Cryptococcus neoformans*. **Mycoses**. v. 53, n. 6, p. 500–503, 2010.

THE PLANT LIST: A Working List of All Plant Species. *Hymenaea martiana* Hayne. Disponível em: <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/ild-19779>. Acesso em: 05/01/2015.

USDA. *Hymenaea martiana* Hayne. Disponível em: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?436261>. Acesso em: 05/01/2015.

Tabela 1. Contagem de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. no leite UHT após a contaminação das concentrações 10^2 , 10^4 e 10^8 nos tempos zero, doze e vinte e quatro horas.

Contagem de <i>Staphylococcus aureus</i> no leite UHT			
Concentração	Tempo 0h	Tempo 12h	Tempo 24h
10^2	0 UFC/MI	0 UFC/mL	0 UFC/mL
10^4	0 UFC/MI	0 UFC/mL	0 UFC/mL
10^8	46 UFC/MI	Incontável	Incontável
Contagem de <i>Escherichia coli</i> no leite UHT			
Concentração	Tempo 0h	Tempo 12h	Tempo 24h
10^2	0 UFC/MI	0 UFC/mL	31 UFC/mL
10^4	0 UFC/mL	8 UFC/mL	Incontável
10^8	$1,3 \times 10^2$ UFC/mL	Incontável	Incontável
Contagem de <i>Salmonella</i> spp. no leite UHT			
Concentração	Tempo 0h	Tempo 12h	Tempo 24h
10^2	Ausência/25mL	Ausência/25mL	Ausência/25mL
10^4	Presença/25mL	Presença/25mL	Presença/25mL
10^8	Presença/25mL	Presença/25mL	Presença/25mL

Incontável = Contagem superior a 300 UFC

UFC = Unidade Formadora de Colônias

Legendas das Figuras

Fig. 1. Cromatogramas em função do tempo de retenção. **a.** Cromatograma Padrão da Rutina ($28,55 \pm 1,3$ min.) **b.** Cromatograma do extrato de folhas do Jatobá (*Hymenaea martiana* Hayne) com a presença da Rutina ($28,55 \pm 1,3$ min.) por espectros de absorção de ultravioleta e a presença de outros compostos majoritários não identificados.

Fig. 2. **a.** Espectro de absorção de ultravioleta (λ Máx. 255,74 e 353,44) da rutina por meio do comprimento de onda (nm) e absorbância (mAU). **b** Gráfico referente à curva de calibração do padrão analítico rutina, com o R^2 de 0,9813. O padrão analítico RUT foi avaliado nas concentrações de 1,44 a 2,16 $\mu\text{g/mL}$ para construção da curva de calibração demonstrada. A partir desses resultados foi possível calcular a quantidade de Rutina presente no extrato sendo observado $106,25 \pm 10,84$ μg de rutina/mg de extrato.

Fig. 3. Extrato etanólico das folhas de *Hymenaea martiana* Hayne. Em 200 μL de extrato a quantidade de rutina é 531,35 μg .

Fig. 4. Material vegetal das folhas de *Hymenaea martiana* Hayne. **a** Presença do fruto e folhas em estado de maturação. **b** Presença das flores em estado de maturação.

Fig. 5. Árvore de *Hymenaea martiana* Hayne (Jatobá) com a presença de toda a estrutura vegetativa.

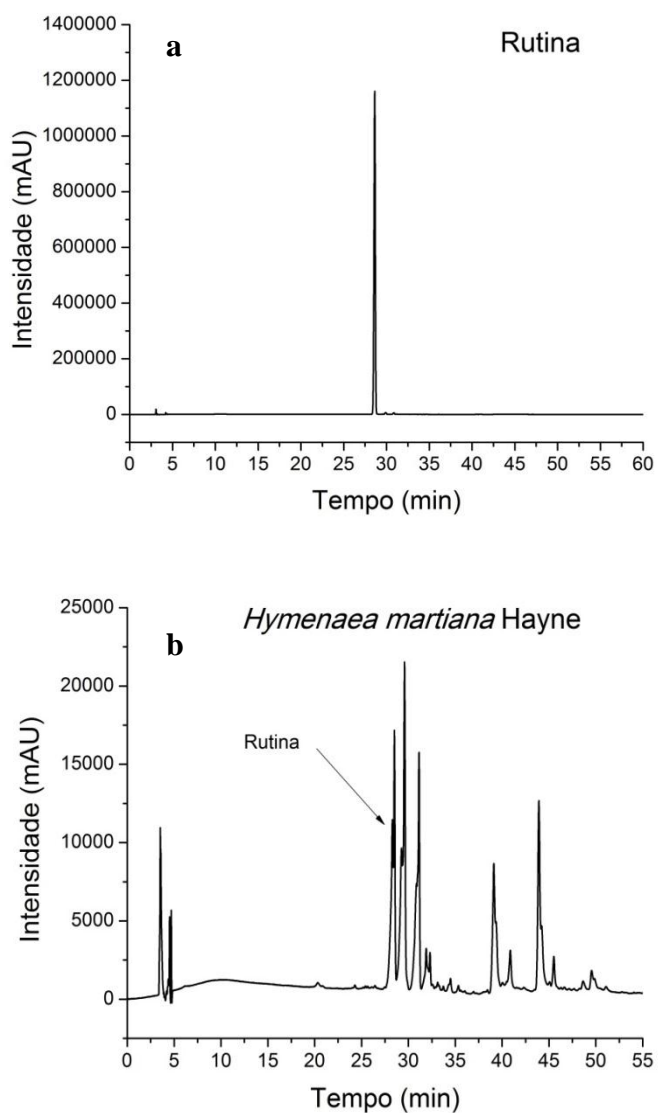


Fig. 1. Cromatogramas em função do tempo de retenção. **a.** Cromatograma Padrão da Rutina ($28,55 \pm 1,3 \text{ min.}$) **b.** Cromatograma do extrato de folhas do Jatobá (*Hymenaea martiana* Hayne) com a presença da Rutina ($28,55 \pm 1,3 \text{ min.}$) por espectros de absorção de ultravioleta e a presença de outros compostos majoritários não identificados.

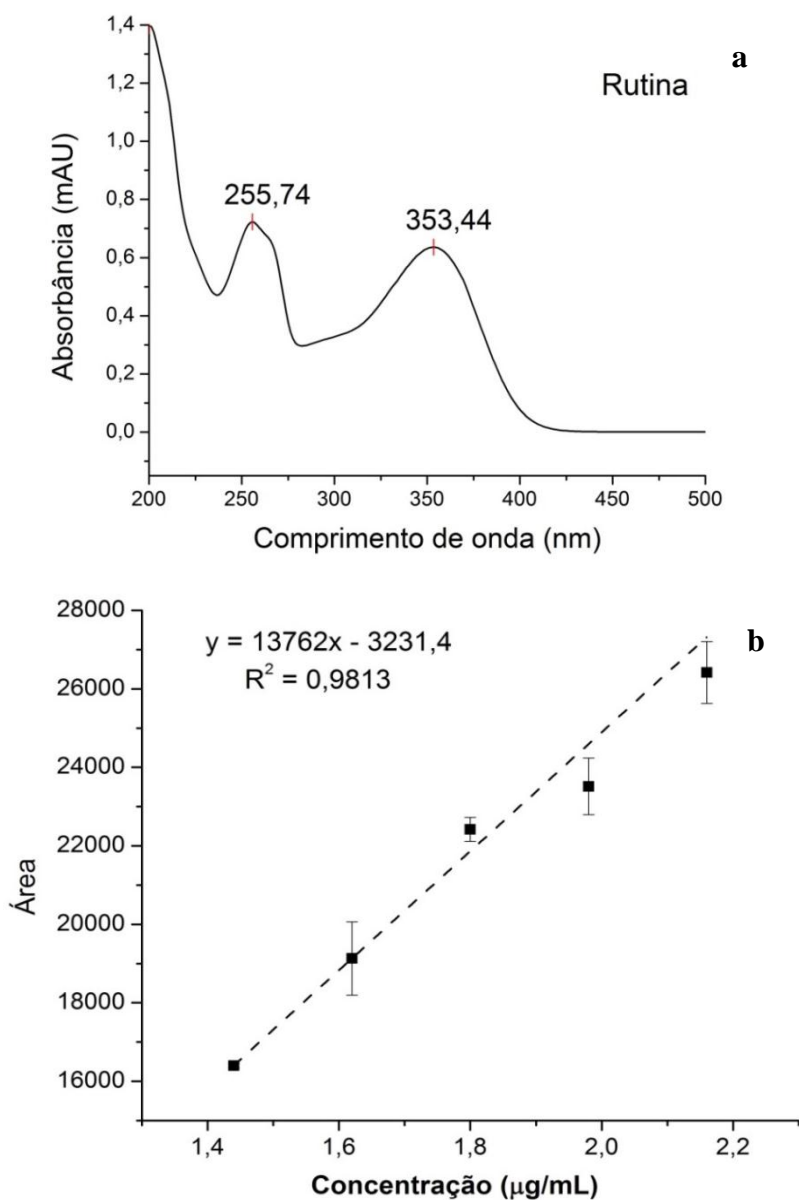


Fig. 2. **a.** Espectro de absorção de ultravioleta ($\lambda_{\text{Máx}}$. 255,74 e 353,44) da rutina por meio do comprimento de onda (nm) e absorbância (mAU). **b** Gráfico referente à curva de calibração do padrão analítico rutina, com o R^2 de 0,9813. O padrão analítico RUT foi avaliado nas concentrações de 1,44 a 2,16 $\mu\text{g/mL}$ para construção da curva de calibração demonstrada. A partir desses resultados foi possível calcular a quantidade de Rutina presente no extrato sendo observado $106,25 \pm 10,84$ μg de rutina/mg de extrato.

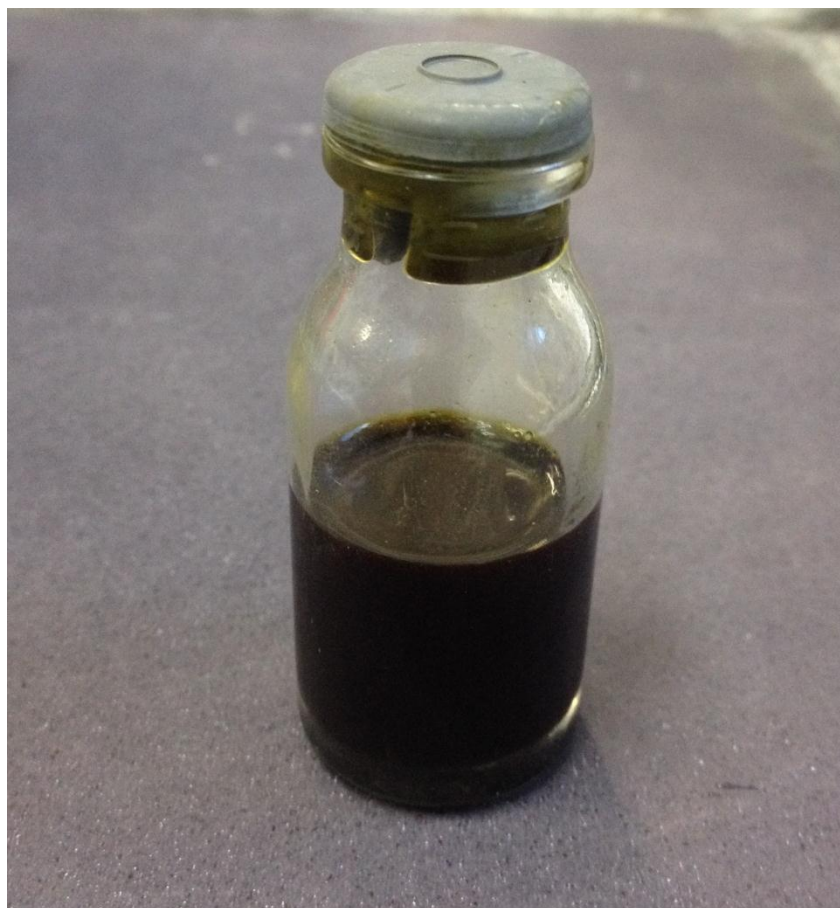


Fig. 3. Extrato etanólico das folhas de *Hymenaea martiana* Hayne. Em 200 μ L de extrato a quantidade de rutina é 531,35 μ g.



Fig. 4. Material vegetal das folhas de *Hymenaea martiana* Hayne. **a** Presença do fruto e folhas em estado de maturação. **b** Presença das flores em estado de maturação.



Fig. 5. Àrvore de *Hymenaea martiana* Hayne (Jatobá) com a presença de toda a estrutura vegetativa.

5. CONCLUSÕES GERAIS

O composto identificado no presente trabalho é um agente antimicrobiano eficaz. A presente investigação representa uma triagem preliminar para atividade antimicrobiana e aponta para a necessidade de profunda investigação fitoquímica e biológica, já que esta espécie possui um grande potencial para produzir produtos biologicamente ativos. Em um estudo mais aprofundado será possível identificar e quantificar novas substâncias. Esses resultados abrem perspectivas para utilização de produtos naturais à base de plantas como alternativa medicinal na guerra contra patógenos humanos. Os estudos até então realizados, com objetivos de identificar e caracterizar as potencialidades das espécies deste gênero precisam ser ampliados e receber uma maior atenção dos órgãos de fomento à pesquisa. Portanto, podemos sugerir o uso do extrato de *Hymenaea martiana* Hayne como alternativa para a redução a carga microbiana do leite visando à produção de queijo coalho.

ANEXOS

Figura A - Determinação da Concentração Bactericida Mínima (*E. coli* ATCC® 35218)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Diluições
A				+									12.500 µg/ML
B				+									6.250 µg/ML
C				+									3.125 µg/mL
D				+									1.562,5 µg/ML
E				+		+							781,2 µg/mL
F	+	+	+	+		+							390,6 µg/mL
G	+	+	+	+		+							125,3 µg/mL
H	+	+	+	+		+							97,6 µg/mL

Legenda:

4 - Controle Positivo: Caldo MH + bactéria

5 - Controle Negativo: somente caldo MH

6 - Controle Diluente: Diluente + bactéria

Figura B - Determinação da Concentração Bactericida Mínima (*S. aureus* ATCC® 25923)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Diluições
A				+									12.500 µg/mL
B				+									6.250 µg/mL
C				+		+							3.125 µg/mL
D				+		+							1.562,5 µg/mL
E				+		+							781,2 µg/mL
F				+		+							390,6 µg/mL
G				+		+							125,3 µg/mL
H	+	+	+	+		+							97,6 µg/mL

Legenda:

4 - Controle Positivo: Caldo MH + bactéria

5 - Controle Negativo: somente caldo MH

6 - Controle Diluente: Diluente + bactéria

Figura C - Determinação da Concentração Bactericida Mínima (*Salmonella sp.* ATCC® 0507028)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Diluições
A				+									12.500 µg/mL
B				+									6.250 µg/mL
C				+									3.125 µg/mL
D				+		+							1.562,5 µg/mL
E	+	+	+	+		+							781,2 µg/mL
F	+	+	+	+		+							390,6 µg/mL
G	+	+	+	+		+							125,3 µg/mL
H	+	+	+	+		+							97,6 µg/mL

Legenda:

4 - Controle Positivo: Caldo MH + bactéria

5 - Controle Negativo: somente caldo MH

6 - Controle Diluente: Diluente + bactéria