

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA  
AGRÍCOLA  
CURSO DE MESTRADO**

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICAS DE OSTRAS (*Crassostrea rhizophorae*) E ÁGUA DE CULTIVO E SUSCETIBILIDADE DE *Escherichia coli* A ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia origanoides***

**GABRIELLY SOBRAL NEIVA**

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA**

**MARÇO - 2016**

**CONDIÇÕES MICROBIOLÓGICAS DE OSTRAS (*Crassostrea rhizophorae*) E ÁGUA DE CULTIVO E SUSCETIBILIDADE DE *Escherichia coli* A ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia origanoides***

**GABRIELLY SOBRAL NEIVA**  
Nutricionista

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2014.

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Isabella de Matos Mendes da Silva

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Ma. Fernanda de Freitas Virgínio Nunes

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA**

**MARÇO - 2016**

## FICHA CATALOGRÁFICA

N417q

Neiva, Gabrielly Sobral.

Qualidade microbiológica de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) e água de cultivo e suscetibilidade de *Escherichia coli* a óleo essencial de *Lippia origanoides* / Gabrielly Sobral Neiva.\_ Cruz das Almas, BA, 2016.  
106f.; il.

Orientadora: Isabella de Matos Mendes da Silva.

Coorientadora: Fernanda de Freitas Virgínio Nunes.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

1. Ostra – Ciência dos alimentos – Qualidade. 2. Ostra – Criação. 3. Microorganismos – Contaminação. I. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II. Título.

CDD: 664

Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas - UFRB.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS**  
**EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA**  
**AGRÍCOLA**  
**CURSO DE MESTRADO**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE**  
**GABRIELLY SOBRAL NEIVA**

**Substituir por scaneado**

---

Profa. Dra. Isabella de Matos Mendes da Silva  
Centro de Ciências da Saúde/UFRB  
(Orientadora)

---

Profa. Dra. Norma Suely Evangelista Barreto  
Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas/UFRB

---

Profa. Dra. Soraia Barreto Aguiar Fonteles  
Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas/UFRB

“Dissertação homologada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola em \_\_\_\_\_ conferindo o grau de Mestre em Microbiologia Agrícola em \_\_\_\_\_.”

*A minha mãe, Gracinha,  
por ser exemplo de força e fé.  
Dedico.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus pela vida e pela oportunidade de aprender. Por nutrir minha fé, acalentando-me nos momentos difíceis. Por me mostrar que as coisas acontecem no momento exato em que deveriam acontecer.

Aos meus pais, Elenildo Neiva e Maria das Graças Sobral, pela vida e educação, em especial a minha mãe, pelo amor, amizade, companheirismo, dedicação e apoio incondicional.

Ao meu irmão Gabriel e sobrinho João, por serem fonte de amor, esperança e animo.

À Professora Doutora Isabella de Matos Mendes da Silva, pela confiança, incentivo, amizade, orientação durante anos de trabalho.

À querida professora Mestre Fernanda Freitas, por toda atenção dedicada, pelo incentivo, orientação, colaboração para realização deste trabalho, amizade e torcida.

À professora Mestre Valéria Camilo, pelo incentivo, torcida e conselhos de vida.

Ao professor Doutor Paulo Juiz, pela orientação e colaboração durante o desenvolvimento dos testes de atividade antimicrobiana.

À comunidade de ostreicultores da Reserva Extrativista Baía do Iguape, por permitir a realização do estudo nas áreas de cultivo e colaboração durante as coletas.

À Lívia Rocha e Edleide Santana, pela colaboração na realização deste estudo e apoio nos momentos de desânimo, tornando minha rotina mais leve.

À Alana Oliveira, minha amiga-irmã, pelo companheirismo, por dividir as alegrias e tristezas da vida comigo, pelo apoio e incentivo diário.

Ao Arthur Silva, meu amor, companheiro no final dessa jornada, pelo apoio e torcida. Por ser alívio nas horas difíceis.

Aos meus amigos, antigos e recentes, distantes e presentes. Muito obrigada pela amizade, companheirismo, amor e carinho sempre a mim dispensados.

À Mestre Jerusa Santana, pelos ensinamentos na área de estatística, pela solicitude, tirando todas as dúvidas.

À Doutora Elizabeth Duarte e Thiago d'Oliveira, pelos ensinamentos sobre Biologia Molecular e o auxílio no desenvolvimento em parte do estudo.

À secretária do Programa de Pós Graduação, Carla Damasceno, por facilitar os quesitos burocráticos, ajudando-me sempre.

A todos os professores do Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola pelos conhecimentos transmitidos, contribuindo para a minha vida profissional.

À Fundação Oswaldo Cruz (FioCruz) do Rio de Janeiro, pela doação das cepas padrão utilizadas nesta pesquisa.

À FAPESB pela concessão da bolsa de estudo e auxílio financeira para desenvolvimento do projeto de pesquisa.

*É bom olhar para trás e  
admirar a vida que soubemos fazer,  
É bom olhar pra frente,  
É bom, nunca é igual.  
(Dessa Vez - Nando Reis)*



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Representação gráfica da localização da Reserva 25  
Revisão de Extrativista Marinha Baía do Iguape com subdivisão em  
Literatura setores – Bahia – Brasil no Sistema de Informações  
Georreferenciadas (Sigeo). Fonte: GENZ, 2006.
- Figura 1 – Fotografia do Gel de agarose a 2% da PCR para gene 66  
Artigo 1 *stx* das amostras de *E. coli* isoladas de ostra e ambiente  
aquático. Tamanho do fragmento 227pb, PM-Peso  
Molecular 100pb, CP- controle positivo, CN- controle  
negativo, amostras positivas (1, 2, 7, 9, 12, 14, 16,  
20,21).
- Figura 2 – Fotografia do Gel de agarose a 2% da PCR para gene 67  
Artigo 1 *bfpA* das amostras de *E. coli* isoladas de ostra e  
ambiente aquático. Tamanho do fragmento 330pb, PM  
Peso Molecular 100pb, CP- controle positivo, CN-  
controle negativo

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Artigo 1	Resultados das análises microbiológicas (log UFC/g) de água de cultivo coletadas em três pontos distintos da Reserva Extrativista Marinha Baía do Iguape, Bahia, 2015.	62
Tabela 2 – Artigo 1	Resultados das análises microbiológicas (log UFC/g <sup>-1</sup> ) de ostras <i>Crassostrea rhizophorae</i> coletadas em três pontos de cultivo da Reserva Extrativista Marinha Baía do Iguape, Bahia, 2015.	63
Tabela I – Artigo 2	Componentes químicos identificados no óleo essencial de <i>Lippia origanoides</i> e seus respectivos índices de Kovats calculados (IKCalc), índices de Kovats da literatura (IKLit).	82
Tabela II – Artigo 2	Concentração Inibitória Mínima (MIC) e Concentração Bactericida Mínima (CMB) de óleo essencial de <i>Lippia origanoides</i> frente à <i>Escherichia coli</i> isoladas de ostra ( <i>Crassostrea rhizophorae</i> ) e cepas de <i>E. coli</i> padrão, 2016.	85

## LISTA DE QUADRO

Quadro 1 – Artigo 1	Sequência dos <i>primers</i> , tamanho dos fragmentos amplificados para detecção de genes associados à virulência de <i>E. coli</i> .	61
------------------------	---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aEPEC	<i>E.coli</i> enteropatogênica atípica
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	Coleção de Tipos de Cultura Americana
BHI	Infusão de Cérebro Coração
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
CT	Coliformes Totais
DAEC	<i>Escherichia coli</i> que adere difusamente
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EMB	Eosina Azul de Metileno
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
ExPEC	<i>Escherichia coli</i> extraentérica
NMP	Número Mais Provável
OE	Óleo Essencial
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
SANUTRI	Núcleo de Segurança Alimentar e Nutricional
tEPEC	<i>E. coli</i> enteropatogênica típica
UFC	Unidade Formadora de Colônias
UFRB	Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

# ÍNDICE

**RESUMO**

**ABSTRACT**

**INTRODUÇÃO ..... 18**

## **CAPITULO 1**

Revisão de literatura: O consumo de ostras, os riscos associados e o uso de antimicrobianos naturais..... 21

Aquicultura..... 22

Produção de ostras na Baía do Iguape..... 24

*Crassostrea rhizophorae*..... 26

Consumo de ostras e os riscos associados..... 28

*Escherichia coli* ..... 31

Antimicrobianos ..... 34

Óleos essenciais ..... 36

**REFERÊNCIAS..... 38**

## **CAPÍTULO 2**

*Escherichia coli* em ostras e água de cultivo da Baía do Iguape-Bahia: ocorrência e caracterização genotípica ..... 55

Resumo..... 55

Abstract..... 56

Introdução..... 57

Material e Métodos..... 58

Resultados e Discussão..... 62

Conclusão ..... 68

Agradecimentos..... 69

**REFERÊNCIAS..... 69**

### **CAPITULO 3**

Atividade antimicrobiana de óleo essencial de <i>Lippia origanoides</i> frente a <i>Escherichia coli</i> isoladas de ostras.....	76
Resumo.....	76
Abstract.....	77
Introdução.....	78
Material e Métodos.....	80
Resultados e Discussão.....	82
Conclusão.....	88
Agradecimentos.....	88
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>88</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>94</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>95</b>

## RESUMO

### NEIVA, G. S. QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE OSTRAS (*Crassostrea rhizophorae*) E ÁGUA DE CULTIVO E SUSCETIBILIDADE DE *Escherichia coli* A ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia origanoides* (Kunth)

A ingestão de moluscos bivalves marinhos, crus ou levemente cozidos, é uma prática comum em todas as regiões litorâneas do Brasil. O consumo desses alimentos pode está associado a ocorrência de Doenças de Transmissão Alimentar. Dentre os moluscos, destacam-se as ostras, pela característica de bioacumular partículas presente no ambiente, propiciando a contaminação por microrganismos patógenos, como *Escherichia coli*. Deste modo, o objetivo do presente estudo foi avaliar a qualidade microbiológica de ostras *Crassostrea rhizophorae* e água de cultivo da Reserva Extrativista Marinha Baía do Iguape – Bahia, caracterizar genotípicamente *E.coli* isoladas dessas amostras e verificar a ação antimicrobiana do Óleo Essencial de *Lippia origanoides* frente as cepas isoladas de amostras de ostras e cepas padrão ATCC dos patotipos EHEC (ATCC 43895), EPEC (CD O111ab), ETEC (ATCC 11229). Foram realizadas quatro coletas em três pontos distintos, no período de janeiro a abril de 2015. Para análise da água utilizou-se da técnica do Número Mais Provável - NMP/100 mL com série de cinco tubos em três diluições. A determinação da população de Coliformes totais (CT) e *E. coli* em ostras foi realizada por meio de método rápido de contagem em placas Petrifilm™ EC (3M Company). O óleo essencial de *Lippia origanoides* foi obtido através de hidrodestilação. Para avaliação da atividade antimicrobiana foi realizado teste de microdiluição em caldo proposto pelo CLSI (2003) com adaptações, para obtenção da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do óleo essencial estudado. As amostras de água apresentaram contagem microbiana média de 1,30 log NMP/100 mL para CT e 2,45 log NMP/100 mL, para coliformes termotolerante, variando entre de 0,83 a 2,08 log NMP/100 mL e 0,66 a 6,80 log NMP/100 mL, respectivamente. A análise microbiológica de ostra evidenciou valores contagem de CT de 0,95 a 4,76 log UFC/g e *E. coli* 0,95 a 6,80 log UFC/g. A caracterização genotípica dos isolados identificou o gene de virulência

*stx*/EHEC em 36,6 % (11/30) das amostras analisadas. Nenhuma das amostras estudadas apresentou o gene de virulência *bfpA*/EPEC. Para determinação da atividade antimicrobiana do OE de *Lippia origanoides*, foi realizada a análise da composição química que revelou ter como composto majoritário o carvacrol (48%) seguido do p-cimeno (6,27 %) e timol (4,10%). Os achados demonstraram que o óleo essencial de *Lippia origanoides* possui ação inibitória frente a todas as cepas estudadas. A CIM para as cepas isoladas de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) foi de 1,09 mg.mL<sup>-1</sup>, sendo esta concentração considerada bacteriostática mínima. A CBM para o isolado do ponto de coleta D foi 1,09 mg.mL<sup>-1</sup> e *E. coli* isoladas dos pontos de cultivo A e C foram 4,37 mg.mL<sup>-1</sup>. As cepas padrão apresentaram CIM e CBM de 1,09 mg.mL<sup>-1</sup>. A concentração bactericida mínima para ETEC foi 1,09 mg.mL<sup>-1</sup> e para EHEC, e EPEC foram de 0,54 mg.mL<sup>-1</sup>. Os resultados microbiológicos apesar de estarem de acordo com os padrões estabelecidos pela legislação internacional, a identificação do gene de virulência nas amostras analisadas sugere cuidado quanto ao consumo das ostras cultivadas neste local. Recomenda-se a produção de ostras controlada de poluição, destacando o monitoramento contínuo dessa área e da qualidade do processo produtivo de ostras. Evidencia-se que o óleo essencial estudado apresenta potencial biotecnológico para o desenvolvimento de antimicrobianos para ser usado no controle de bactérias patogênicas.

**Palavras chave:** Aquicultura, contaminação bacteriana, moluscos bivalves, antimicrobianos naturais.



## ABSTRACT

### NEIVA, G.S. CONDITIONS OF OYSTERS MICROBIOLOGICAL (*Crassostrea rhizophorae*) AND WATER CULTURE AND SUSCEPTIBILITY *Escherichia coli* OIL ESSENTIAL *Lippia origanoides* Lippia (Kunth)

The intake of marine bivalve molluscs, raw or lightly cooked, is a common practice in all the coastal regions of Brazil. The consumption of these foods is associated with the emergence of Food Transmitted Diseases. Among the clams, oysters stand-by feature bioaccumulate particles present in the environment, leading to contamination by pathogenic microorganisms such as *Escherichia coli*. Thus, the aim of this study was to evaluate the microbiological quality of *Crassostrea rhizophorae* and cultivation water of Reserve Marine Extractive Bay Iguape – Bahia, phenotypically characterize *E. coli* isolated from these samples and check the OE antimicrobial action *Lippia origanoides* front isolated strains of oysters and standard strains of EHEC pathotypes samples ATCC (ATCC 43895), EPEC (ATCC CD O111ab), ETEC (ATCC 11229). Four samples were taken at three different points in the period January to April 2015. For analysis of the water used is the number of technical More Likely - NMP / 100 mL with series of five tubes in three dilutions. The determination of population of total coliforms (TC) and *E. coli* in Oysters was performed by rapid method of count Petrifilm™ EC plates (3M Company). The essential oil of *Lippia origanoides* was obtained by hydrodistillation. To evaluate the antimicrobial activity was conducted microdilution test broth proposed by the CLSI (2003) with adaptations, to obtain determining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of the essential oil studied. Water samples had a mean microbial count of 1.30 log NMP/100 mL for CT and 2.45 log NMP/100 mL, for thermotolerant coliforms, ranging from 0.83 to 2.08 log NMP/100 mL and from 0.66 to 6.80 log NMP/100 mL, respectively. The Oyster microbiological analysis showed CT count values from 0.95 to 4.76 log UFC/g and *E. coli* from 0.95 to 6.80 log UFC/g. Genotypic characterization of isolates identify the virulence gene *stx*/EHEC in 36.6 % (11/30) of the samples. None of the samples showed the virulence gene *bfpA*/EPEC. The chemical composition analysis has revealed as major compound carvacrol (48%) followed by p-cymene (6.27%) and thymol (4.10%).The findings

showed that the essential oil of *Lippia origanoides* has inhibitory action across all studied strains. The MIC for the isolated strains of oysters (*Crassostrea rhizophorae*) was  $1.09 \text{ mg.mL}^{-1}$ , which is considered minimal bacteriostatic concentration. CBM to isolate the pickup point D was  $1.09 \text{ mg.mL}^{-1}$  and *E. coli* isolated from the growing points A and C were  $4.37 \text{ mg.mL}^{-1}$ . The standard strains showed MIC and MBC of  $1.09 \text{ mg.mL}^{-1}$ . The minimum bactericidal concentration was 1.09 to ETEC  $\text{mg.mL}^{-1}$  and EHEC and EPEC were  $0.54 \text{ mg.mL}^{-1}$ . Microbiological results although they are in accordance with the standards established by international law, virulence gene identified in part of the samples suggests careful about consumption of oysters grown in this location. It is recommended the production of controlled oyster pollution, highlighting the continuous monitoring of the area and the quality of the production process of oysters. It is evident that the essential oil has been studied biotechnological potential for the development of antimicrobial to be used in the control of pathogenic bacteria.

**Keywords:** Aquaculture, contamination Bacterial, Bivalve Mollusks, natural antimicrobials.

# INTRODUÇÃO

O consumo de organismos aquáticos originários de águas contaminadas pode levar ao aparecimento de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), que podem ser causadas tanto por um agente infeccioso contaminante do alimento ingerido, como pela toxina por ele produzida no alimento (BRASIL, 2001).

Dentre os pescados com potencial causador de DTA destacam-se as ostras devido às características anátomo-fisiológicas, podendo bioacumular resíduos ambientais, uma vez que esses moluscos vivem geralmente em estuários e em áreas costeiras passíveis de poluição.

Salienta-se que a qualidade dos moluscos como alimento está estritamente relacionada às condições do ambiente. A degradação ambiental, muitas vezes decorrente do deságue de efluentes domésticos, industriais e agrícolas, prejudica o crescimento do molusco e compromete a segurança do alimento (GARCIA; BARROSO, 2007).

A presença de microrganismos patogênicos em bivalves também pode estar associada a deficiências nas etapas de processamento ou na conservação do produto, comprometendo a sua qualidade e podendo causar sérios danos à saúde do consumidor, que vão desde uma simples intoxicação até a morte (VIEIRA; REBOUÇAS; ALBUQUERQUE, 2006). Desta maneira, destaca-se a importância de cultivar os moluscos em um ambiente com água de boa qualidade para a produção de alimentos nutritivos e seguros para a saúde dos consumidores (RUPP et al., 2008).

A presença dos coliformes termotolerantes, como a *Escherichia coli*, em ostras indica que o alimento apresenta uma contaminação microbiana de origem fecal e, portanto, está em condições sanitárias insatisfatórias, podendo acarretar o surgimento de sintomas característicos de DTA (SILVA, 2003).

A maioria das linhagens de *E. coli* são comensais, porém, algumas podem causar uma grande variedade de doenças. Cepas patogênicas de *E. coli* como, enterohemorrágicas (EHEC) e enteropatogênicas (EPEC), podem ocasionar sintomas clínicos clássicos com diarreia, náuseas e hipertermia ou ainda progredir para síndrome hemolítica-urêmica, infecções de bexiga e rim, septicemia,

pneumonia e meningite, devido aos fatores de virulências, sorotipagem, manifestações clínicas e epidemiologia (KAPER et al., 2004).

Os fatores de virulência dos patótipos de *E. coli* possibilitam que se fixem as células epiteliais intestinais do hospedeiro por meio de fimbrias ou adesinas. Esta ligação leva a proliferação microbiana no trato intestinal, liberação das toxinas nos enterócitos e, conseqüente, sintomatologia característica (NGELEKA et al., 2003).

No tratamento das toxinfecções alimentares usualmente a população faz uso de diversos antimicrobianos, no entanto, a administração indiscriminada desses compostos no tratamento e prevenção de doenças tem se tornado um problema para a saúde pública, devido ao aumento de bactérias resistentes aos diferentes fármacos.

Ressalta-se que esse uso descontrolado de antimicrobianos sintéticos tem ocasionado o aumento da resistência de cepas bacterianas isoladas de alimentos a diferentes compostos antimicrobianos de uso clínico, como evidenciado em *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* e *Salmonella* (BANERJEE e SAKKAR, 2004; SOUZA, 2006).

Alternativas substitutivas aos antibacterianos usuais são urgentemente requeridas, tais como os antimicrobianos naturais, que se configuram como compostos adicionados ou presentes em alimentos, tendo a função de retardar ou inibir o desenvolvimento microbiano, a exemplo dos óleos essenciais (BRUGALLI, 2003; TIPPAYATUM e CHONHENCHOB, 2007).

Os óleos essenciais (OE) são produtos do metabolismo secundário das plantas e possuem composição química complexa, cujos componentes estão em diferentes concentrações (SIMÕES e SPITZER, 2000; SIQUI et al., 2000, GONÇALVES et al., 2003). A maior parte da atividade antimicrobiana do OE parece estar associada aos compostos fenólicos, cujo efeito antimicrobiano está relacionado, principalmente, à alteração da permeabilidade e integridade da membrana celular bacteriana (LAMBERT et al., 2001).

Os OEs com ação antimicrobiana possuem baixo risco de desenvolvimento de resistência microbiana frente a sua ação, devido à composição complexa dos óleos, formados por misturas de componentes, que, podem apresentar diferentes mecanismos de atividade antimicrobiana, e, desta forma, torna mais difícil a adaptabilidade dos microrganismos (DAFERERA et al., 2000).

Além disso, esses produtos não são prejudiciais ao meio ambiente e menos agressivos à saúde do homem, no que se refere aos resíduos farmacológicos. Assim, antimicrobianos naturais vêm sendo explorados também na medicina veterinária, microbiologia, parasitologia, aquicultura e tecnologia de alimentos.

Dentre os antimicrobianos naturais destaca-se o óleo essencial de *Lippia origanoides* (Kunth), conhecido popularmente por alecrim pimenta ou alecrim de tabuleiro, cuja atividade antimicrobiana apresenta amplo espectro de ação, frente a bactérias Gram positivas e Gram negativas, fungos e leveduras.

Os produtos obtidos da extração de *Lippia* spp têm sido amplamente testados cientificamente, devido ao potencial dos princípios bioativos. Estudos em diversas áreas do conhecimento vêm confirmando tais atividades terapêuticas propaladas na medicina popular (GOMES et al., 2011).

## **CAPITULO 1**

**Revisão de Literatura: O consumo de ostras, os riscos associados e o uso de antimicrobianos naturais**

## Aquicultura

A aquicultura constitui-se como o cultivo de diversos organismos aquáticos, incluídos neste contexto peixes, moluscos, crustáceos e plantas aquáticas, sendo que a intervenção ou manejo do processo de criação é imprescindível para a produção (SILVA et al., 2014).

O cultivo controlado ou semi-controlado de animais aquáticos pelo homem é uma atividade que teve início na China, há uns 4.000 anos aproximadamente, com o monocultivo da carpa. A história do manejo de pescado em cativeiro aproveitando represamentos, baías, igarapés e estuários vêm da necessidade humana em garantir alimentos para as comunidades e da evolução social oriunda da observação da natureza da população praieira e ribeirinha (CAMARGO e POUHEY, 2005; SILVA et al., 2014).

Estima-se que a produção mundial de pescado no ano de 2012 foi de 158 milhões de toneladas, os quais 136,2 milhões de toneladas foram utilizados para o consumo humano, dessas cerca de 66,6 milhões de toneladas (48,9 %) tiveram origem na aquicultura, sendo os peixes os organismos aquáticos mais cultivados, com uma produção de 44,1 milhões de toneladas, seguidos pelos moluscos, com 15,2 milhões de toneladas, e crustáceos, com 6,4 milhões de toneladas (FAO, 2014).

Os países que tiveram maiores produções nesse período estão concentrados no continente asiático, destacando a China em primeiro lugar, com mais de 41 milhões de toneladas produzidas em 2012, seguida pela Índia, com 4,2 milhões de toneladas. O Brasil ocupa a 12ª posição da produção mundial, com 707.461 de toneladas e segundo lugar na produção da América Latina, ficando atrás apenas do Chile que produz 1.071.421 de toneladas (FAO, 2014).

A expectativa é que em 2030 a aquicultura seja responsável por mais de 60 % da produção mundial de pescado para consumo humano, segundo a publicação *Fish to 2030* (FAO, 2014).

Dentre os diversos tipos de cultura de pescado, destaca-se a malacocultura, que refere-se à criação de moluscos para consumo humano, sejam estes de águas doces, marinhas ou terrestres (AGUDO, 2008).

O cultivo de moluscos é uma alternativa eficiente de produção de pescado, especialmente por ofertar baixos custos para sua instalação, material de fácil

obtenção, facilidade na captação de sementes, manuseio e ao mesmo tempo um alto índice de rentabilidade, sendo uma alternativa para a pesca artesanal ou para manutenção e reposição dos estoques naturais (SILVA e SILVA, 2007).

O Brasil destaca-se como potencial produtor por apresentar uma das maiores linhas de costa do mundo, com cerca de 8.500 km de extensão, e uma grande diversidade de organismos marinhos, considerados recursos econômicos e naturais, uma vez que o pescado representa importante fonte de alimento e trabalho. Embora a pesca brasileira seja uma atividade econômica das mais tradicionais, a produção de pescado de origem marinha não é conhecida com precisão (NAYLOR, 2000).

De acordo com dados lançados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, a produção brasileira de aquicultura no ano de 2014 foi de 22.091,88 toneladas (IBGE, 2014).

Na Aquicultura, a região Nordeste foi a maior produtora em 2014, com 147,38 toneladas de moluscos bivalves, seguida pela região Norte, com 139,21 toneladas. Em 3º lugar está a região Sul, com 126,14 toneladas; em 4º lugar a região Centro-Oeste, com 90,05 toneladas, e em último lugar encontra-se a região Sudeste, com 53,46 toneladas (IBGE, 2014).

A ostreicultura é uma atividade que merece destaque, considerando-se que as ostras, devido a característica filtradora de alimentação representam maior viabilidade econômica na produção quando comparado com outras atividades aquícolas (OLIVEIRA, 1998).

O cultivo de ostras se desenvolve principalmente em ambientes estuarinos e regiões costeiras, utilizando diferentes métodos de cultivo, como *long line*, balsas flutuantes e mesas fixas, de acordo com a característica dos ambientes costeiros, condições ambientais e tradição local (FAO, 2006).

A ostreicultura é marcada por uma produção fundamentada na unidade familiar e proporciona alternativas econômicas para as comunidades pesqueiras, garantindo sua permanência em seu local de origem. Com o mercado em expansão, a atividade tem grande perspectiva de consolidação e ampliação para uma escala industrial (BRANDINI et al., 2000; BAHIA PESCA, 2012).

Desta forma, a ostreicultura pode promover a inclusão social mediante o incremento da renda familiar, promoção da igualdade entre gêneros e fortalecimento da segurança alimentar das comunidades ribeirinhas. Do ponto de



vista econômico, o cultivo de ostras pode contribuir para a expansão comercial, diversificando a culinária regional e gerando emprego e renda para a população costeira. Do ponto de vista ambiental, o cultivo de ostras pode reduzir a pressão sobre os estoques naturais, reduzindo a forma extrativista de coleta, além de exigir melhor qualidade da água no local de cultivo (GOMES, 2008).

### **Produção de ostras na Baía do Iguape**

O Estado da Bahia é caracterizado por possuir paisagem diversificada, litoral com 1.188 km de extensão, representando 13,2 % da costa brasileira e por apresentar grande número de estuários cujas bordas caracterizam-se pela formação de mangues arbóreos, ricos em numerosas espécies utilizáveis na alimentação e de relevância socioeconômica (BAHIA PESCA, 1994).

A produção estimada de moluscos bivalves no Estado da Bahia foi de 71,28 toneladas, no ano de 2014. Destaca-se o município de Cachoeira, com produção de 10,5 toneladas, ocupando o segundo lugar na produção do Estado (IBGE, 2014).

Dentre essas regiões estuarinas de potencial produtor destaca-se, principalmente, a Baía de Todos os Santos, que concentra atividades portuárias e industriais. O desenvolvimento dessas atividades podem afetar, sobretudo, a ecologia da região, em decorrência da poluição de origem urbana e industrial, acentuada por um intenso processo de ocupação desordenada que vem contaminando e destruindo os manguezais (BAHIA PESCA, 1994).

A Reserva Extrativista Marinha da Baía do Iguape é uma unidade de conservação federal categorizada como reserva extrativista e criada por Decreto Presidencial em 11 de agosto de 2000. Possui uma área aproximada de 8.117,53 hectares, sendo 2.831,24 ha em terrenos de manguezais e 5.286,29 ha de águas internas no Estado da Bahia (BRASIL, 2000). Está localizada no extremo oeste da Baía de Todos os Santos nos municípios de Maragogipe e Cachoeira, a margem direita do Rio Paraguaçu, conforme observado na figura 1, e as comunidades do seu entorno vivem de seus ecossistemas próprios ou associados, praticando várias atividades que contemplam o uso social dos recursos naturais (PROST, 2007).

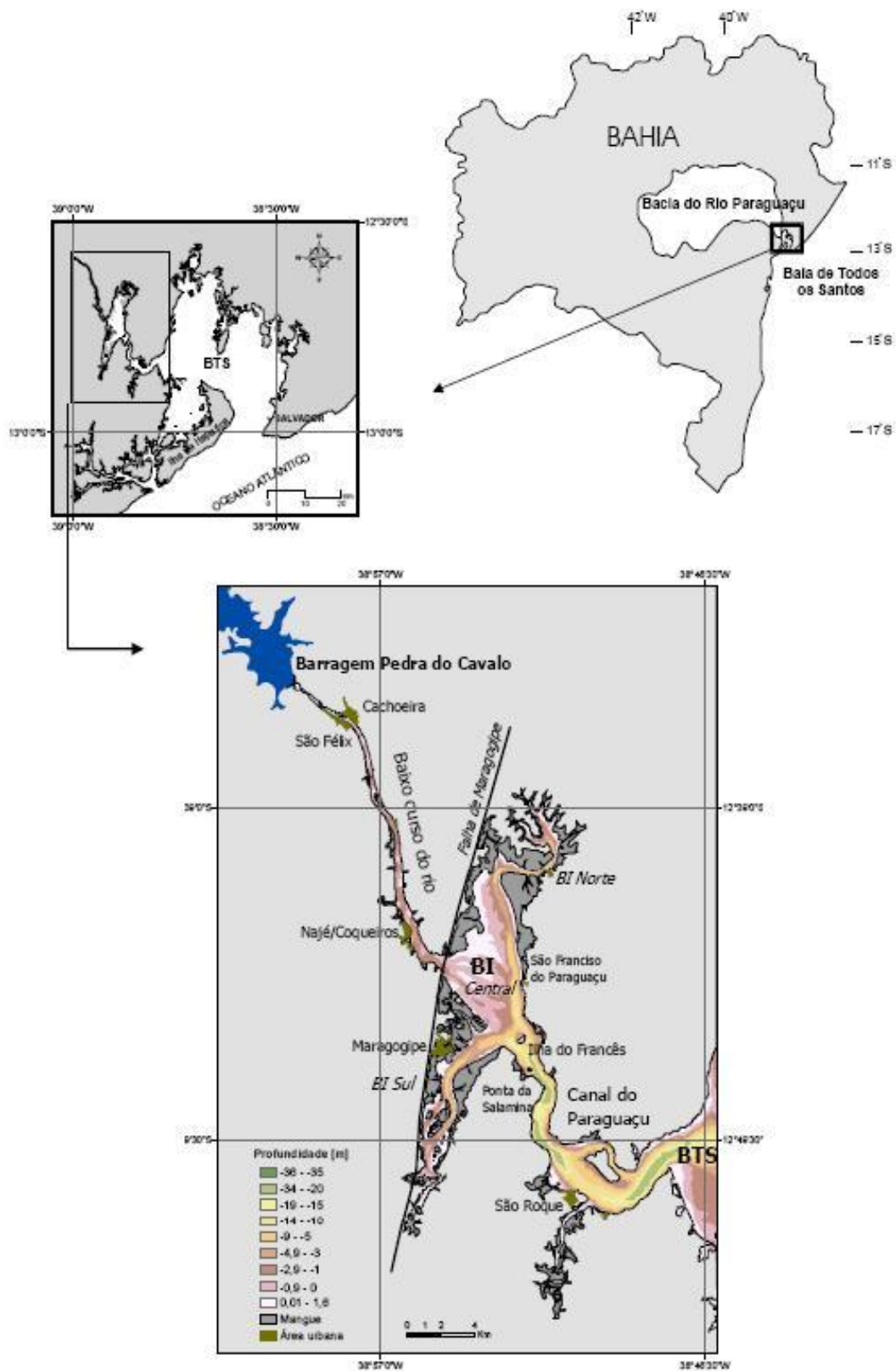


Figura 1. Representação gráfica da localização da Reserva Extrativista Marinha Baía do Iguape com subdivisão em setores – Bahia – Brasil no Sistema de Informações Georreferenciadas (Sigeo). Fonte: GENZ, 2006.

A região traz possibilidades produtivas aos agricultores familiares vinculados à pesca, como coleta de marisco e ao cultivo de ostra, pois, possui paisagem diversificada, reunindo praias, falésias, manguezais e rios que favorecem a existência de um grande número de espécies de pescado.

As ostras que são cultivadas na Baía do Iguape, são da espécie *Crassostrea rhizophorae*. O gênero *Crassostrea* reúne as ostras de maior interesse econômico em função do valor nutricional da carne, com elevado valor de proteínas, vitaminas (A, B1, B2, C e D) e minerais (fósforo, cálcio, ferro e iodo), além de glicogênio (PEREIRA et al., 1998; PACHECO et al., 2004; OPAS, 2009).

Atualmente, os moluscos beneficiados nessa região atendem a subsistência das famílias das 14 comunidades que formam a Bacia e Vale do Iguape e abastece o mercado de cidades circunvizinhas como Cachoeira, São Félix, Maragogipe e Santo Amaro. Além disso, boa parte do cultivo das ostras é destinada aos estabelecimentos produtores de alimentos de Salvador, capital do Estado (FREITAS, 2012).

### ***Crassostrea rhizophorae***

A espécie *Crassostrea rhizophorae* conhecida como ostra nativa ou ostra do mangue pertence ao Filo Mollusca, Classe Bivalvia, Família Ostreidae, Gênero *Crassostrea* (BARNES, 1990). Caracterizado por organismos com estrutura física composta basicamente por um corpo macio, protegido por duas sessões de conchas calcárias duras e unidas por um ligamento do tipo dobradiço em uma das extremidades (WHEATON, 2007). A carne propriamente dita é ligada a concha nas extremidades do músculo adutor o qual une as duas valvas, sendo o responsável pelo fechamento das mesmas (BARNABÉ, 1996; RUPP, 1999).

A forma da concha é bastante variável e depende do ambiente onde as ostras crescem, sendo usualmente alongada. A valva inferior ou esquerda é côncava, e fica encaixada sob a articulação, sendo esta a valva sobre a qual a ostra encontra-se fixada ao substrato, enquanto a valva superior ou direita é plana (RUPP, 1999).

*Crassostrea rhizophorae* é uma espécie hermafrodita protândrica, de tamanho médio, que alcança tamanho de 100 mm, concha grossa e de forma variável, geralmente larga e de tonalidade clara a escura. A valva superior é plana

e menor que a inferior, distribui-se do Caribe ao Atlântico sul-americano até o Brasil (VILLARROEL et al., 2004), é típica de zonas tropicais e ocorre principalmente fixada às raízes aéreas do mangue vermelho (*Rhizophora mangle*), ou sobre zonas intertidais e costões rochosos (NASCIMENTO, 1983).

As espécies do gênero *Crassostrea* são consideradas eurihalinas e euritêrmicas, podendo habitar diferentes ambientes, sobretudo estuários, onde há interação entre a água salgada e doce ocorrendo grandes variações de salinidade e com grande aporte de matéria orgânica e alta produtividade primária (PRITCHARD, 1967).

Outra característica física desta espécie é o grande desenvolvimento dos cílios branquiais, que são responsáveis pela respiração e filtração do alimento, estes produzem uma corrente de água até o interior do animal, enviando as partículas em suspensão até os filamentos branquiais, onde são retidas e levadas por batimentos ciliares até os palpos labiais (RUPP, 1999; FURLAN, 2004). Possuem capacidade de filtrar até 10 litros de água por hora e cerca de 200 litros por dia, podendo adsorver e bioacumular as partículas de detritos e os microrganismos presentes na corrente aquática (MIOSSEC et al., 2009; MAMEDE, 2012).

Os alimentos adsorvidos são enzimaticamente atacados desde o momento em que penetram nos condutos da glândula digestiva. Porém, é possível observar células vivas presentes no estômago nas seis horas seguintes à ingestão e durante oito a dezesseis horas no intestino (BARNABÉ, 1996). Assim, bactérias patogênicas, que estejam eventualmente presentes na água de cultivo, após serem filtradas poderão permanecer viáveis no trato digestivo das ostras (MORAES et al., 2000).

A capacidade de acumulação de partículas confere as ostras à capacidade de serem instrumentos utilizados no monitoramento de contaminantes em águas estuarinas, atuando como bioindicadores ambientais.

O problema tende a se agravar quando há aumento da temperatura ambiental, pois as taxas de filtração e de crescimento das ostras também são aceleradas nessas condições (CHRISTO, 2006), conseqüentemente aumentando a possibilidade de ingestão de bactérias patogênicas pelas ostras.

Recomenda-se para criação desses moluscos, o cultivo suspenso em estruturas fixas em travesseiros cuja vantagem de não expor os moluscos aos

predadores do fundo do ambiente aquático, mantêm a ostra em imersão e expostas conforme a flutuação da maré, desta forma, as ostras adquirem maior resistência e permanecem vivas por mais tempo durante a comercialização por manter água em seu interior além de permitir produtividade de forma sustentável (MENEZES, 2005).

### **Consumo de ostras e os riscos associados**

Cada vez mais os consumidores buscam alimentos que confirmem segurança alimentar dentro e fora do ambiente domiciliar, o que significa garantir o consumo de alimentos que atendam aos aspectos nutricionais, as características sensoriais desejáveis, a higiene sanitária, representada pela ausência de microrganismos e a ausência de riscos físicos e químicos (GOMES, 2007).

A ingestão de moluscos bivalves marinhos, crus ou levemente cozidos, é uma prática que pode transmitir microrganismos patogênicos ao homem (PEREIRA, 2006).

Devido ao seu hábito alimentar filtrador, os moluscos bivalves concentram em seu corpo microrganismos e poluentes químicos existentes no meio, o que os destacam como bioindicadores de poluição das águas e veiculadores de doenças (LEAL; FRANCO, 2008).

O consumo de organismos aquáticos contaminados podem levar a ocorrência de DTA que podem ser causadas tanto por um agente infeccioso contaminante do alimento ingerido, como pela toxina por ele produzida (BRASIL, 2001).

Nas últimas décadas o consumo de moluscos bivalves tem aumentado consideravelmente no mundo inteiro. Juntamente com essa tendência, surtos de doenças associadas ao consumo destes organismos têm sido cada vez mais relatados em todos os continentes (VIEIRA, 2011). A maioria dos surtos encontram-se relacionados à ingestão do alimento cru, sendo as ostras os organismos mais envolvidos (POTASMAN; PAZ; ODEN, 2002).

A microbiota do pescado e da maioria dos moluscos bivalves é bastante variada e depende da qualidade da água na qual é capturado e/ou cultivado, da qualidade da água que se utiliza para sua lavagem, e de outros fatores

ambientais, como salinidade, temperatura, salubridade do ambiente podendo ser detectados nesses animais bactérias, como *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Lactobacillus*, podem ser encontrados vírus, como o da Hepatite A e *Rotavírus* (ARASAKI, 2002; COELHO et al., 2003; VIEIRA, 2004; KITTIGUL, et al., 2007; LEE et al., 2008).

Estes patógenos podem estar no ambiente e serem veiculados para o ser humano no momento da ingestão do molusco (CRUZ-ROMERO et al., 2008).

O primeiro surto registrado associado ao consumo de ostras cruas foi reportado por Pasquier em 1816, com caso de febre tifóide em grupo de franceses (POTASMAN et al, 2003).

A maior epidemia associada ao consumo de moluscos ocorreu em 1988 em Shanghai, China, tendo sido relatados mais de 300.000 casos de hepatite A. A epidemia foi causada pelo consumo de moluscos crus capturados em um porto que recebia despejos de esgotos domésticos sem tratamento (COKK et al, 2001).

Investigando 1.266 casos de surtos associados a vírus Norwalk em moluscos, de 1991 a 1998, Burkhardt e Calci (2000) identificaram que 78 % das doenças ocorreram devido ao consumo de ostras capturadas na Costa do Golfo.

Dados epidemiológicos do Ministério da Saúde apontam que o pescado, que inclui peixe, crustáceos e moluscos bivalves foi responsável por cerca de 1.185 casos de surtos notificados no Brasil entre os anos de 2000 a 2015 (BRASIL, 2015). Esta incidência possivelmente tem relação com a característica anatômica e biológica do animal, à qualidade da água na qual este foi cultivado, às técnicas de manipulação de pós-captura e beneficiamento.

Em estudo realizado no estuário em Cananéia, São Paulo, com ostras *C. rhizophorae* com e sem tratamento de depuração, Ristori et al (2007) verificaram que as amostras de ostras não tratadas, 80 %, 70 %, e 10 % eram positivas para *V. vulnificus*, *Aeromonas*, e *Salmonella*, respectivamente. Para as amostras de ostras tratadas 60 %, 30 %, e 0 % foram positivas para *Escherichia coli* O157:H7, *Shigella* spp, e *V. cholerae*, respectivamente.

Rodrigues e Carvalho Filho (2011) ao pesquisar a presença de *Vibrio parahaemolyticus* em pontos da cadeia produtiva das ostras oriundas da Baía do Iguape, evidenciaram que as ostras cultivadas nesta região possuem grande potencial de risco àqueles que consumirem estes moluscos crus.

Ostras coletadas no estuário do rio Cocó, Ceará, apresentaram contaminação por coliformes termotolerantes, que inclui *Escherichia coli*, em 30 % das amostras pesquisadas (SILVA et al., 2003).

Pesquisas realizadas por Doi et al. (2015), em estuário de Cananéia, São Paulo, determinaram uma forte correlação das densidades de coliformes totais e termotolerantes entre a água e o tecido da ostra, concluindo que a qualidade bacteriológica dos moluscos bivalves refletiu aquela da água analisada.

A captura de ostras em bancos naturais ou sistemas de cultivo, somados aos riscos de toxinfecções alimentares evidencia a necessidade da avaliação microbiológica tanto das ostras como da água de origem, a fim de garantir a saúde da população através de um alimento seguro para o consumidor (FRANCESCHI et al., 2009).

A contaminação por *E. coli* em ostras e as suas variações de intensidade, tem sido normalmente associada à contaminação fecal ou à poluição das águas naturais ou de ambientes aquáticos, onde estes organismos podem sobreviver durante um longo período, ou à contaminação direta dos produtos durante o processamento, bem como por vários efeitos ambientais como marés, pluviosidade e posicionamento do cultivo (HUSS, 1997; YOUNGER, LEE & LEES, 2003).

Deste modo, estudos demonstram *E. coli* como microrganismo indicador da qualidade sanitária das águas onde os moluscos são cultivados e dos próprios moluscos bivalves (BARARDI et al., 2006).

É de grande importância o acompanhamento da qualidade da água no local onde ocorre a produção e coleta de moluscos bivalves destinados ao consumo humano. Tendo em vista minimizar os riscos para a saúde pública, a qualidade microbiológica das águas torna-se um fator fundamental para que estes possam ser comercializados com total segurança para o consumidor (LENOCH, 2004).

Neste contexto, destaca-se a importância de cultivar os moluscos em um ambiente com água de boa qualidade para a produção de alimentos nutritivos e seguros para a saúde dos consumidores. Por isso é fundamental que o processo de crescimento das cidades costeiras seja acompanhado por uma expansão adequada de sistemas de tratamento de esgoto e com consciência da importância da preservação dos ambientes costeiros, em conjunto com políticas de proteção ambiental, e com constante monitoramento da qualidade da água. Isso colabora

com a expansão da produção de moluscos de alta qualidade na costa do Brasil (RUPP et al., 2008).

### ***Escherichia coli***

Dentre as bactérias associadas a ostras e água de cultivo destaca-se *E. coli*, que se constitui em um bacilo Gram negativo, anaeróbio facultativo, pertencente à família Enterobacteriaceae, além de fermentar glicose e lactose com produção de ácido e gás, dentre alguns atributos úteis na sua identificação (ITO et al., 2007).

A maioria das cepas de *E. coli* se multiplica em baixas temperaturas, entre 4 e 5 °C, sendo a temperatura ótima em torno de 37 °C, existem relatos de sobrevivência por mais de nove meses em temperatura de congelamento (-20 °C) (DOYLE; SCHOENI, 1987). Temperaturas entre 60 °C e 70 °C por 30 minutos são capazes de inativar a maioria das cepas. Em relação ao pH, elas são consideradas neutrófilas, crescendo numa faixa entre 4,5 a 9, sendo que em pH extremo não é capaz de eliminar a célula (JAY, 2010).

É o microrganismo mais frequente no trato digestório do homem e dos animais de sangue quente. Geralmente as cepas são encontradas confinadas no lúmen intestinal, porém em hospedeiros imunossuprimidos ou quando as barreiras gastrointestinais são atravessadas elas podem causar doenças infecciosas, além disso, algumas cepas mutagênicas podem causar doenças em hospedeiros saudáveis (BARROS, 2009; NAKAZATO et al., 2009).

Existem cepas de *E. coli* que adquiriram fatores específicos de virulência e desenvolveram a capacidade de causar um amplo espectro de doenças em humanos e até mesmo indivíduos saudáveis podem ser susceptíveis à infecção por esses agentes (KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004; WILLIAMS, TORRES e LLOYD, 2010). As estirpes patogênicas de *E. coli* causam basicamente três síndromes clínicas: infecção do trato urinário, sepse/ meningite e diarreia (NATARO e KAPER, 1998; HARRINGTON, DUDLEY e NATARO, 2005).

A caracterização de *E. coli* patogênicas é baseada nos fatores de virulência, nas manifestações clínicas, tratamento e na epidemiologia do hospedeiro (HUANG et al., 2006).



As espartes que causam diarreia humana podem ser divididas em sete grupos: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica também conhecida como produtora de toxina Vero ou Shiga (EHEC, VTEC ou STEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enteropatogênica típica (tEPEC), *E. coli* enteropatogênica atípica (aEPEC) *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* de aderência difusa (DAEC) (NATARO e KAPER, 1998; KAPER, NATARO e MOBLEY, 2004).

Dentre as estirpes diarreiogênicas de *E. coli* destaca-se a enteropatogênica (EPEC), descrita na literatura como primeiro patotipo de *E. coli* a ser identificado sorologicamente e associado com casos de diarreia em crianças, sendo a aderência um dos seus principais fatores de patogenicidade (RODRÍGUEZ-ANGELES, 2002).

As cepas de *E. coli* enteropatogênica (EPEC) têm sido isoladas em alimentos e na água, sendo consideradas como importante agentes de diarreia e mortalidade infantil em países em desenvolvimento (NATARO e KAPER, 1998; CHANDRA *et al.*, 2012)

O processo central da patogênese da EPEC esta baseado no desenvolvimento de lesões chamadas de “attaching and effacing” (A/E). Ocorre a aderência da bactéria na mucosa do intestino delgado e há a destruição das microvilosidades intestinais. A sintomatologia da doença é caracterizada por diarreia aguda, febre, mal-estar e vômito, por vezes acompanhada de desidratação (LEVINE, 1987). Em infecções severas há uma destruição completa da superfície absorviva do intestino, com atrofia das vilosidades e redução da mucosa. A observação da formação dessas lesões foi crucial para identificar a aderência bacteriana como um importante fator para a patogenia de EPEC (CHEN e FRANKEL, 2005).

Outro patotipo de interesse humano é a enteroemorrágica (EHEC), cujas cepas podem provocar lesões por adesão às células do hospedeiro, apresentando sintomas, como diarreia sanguinolenta e dor abdominal, sendo diferenciada de outras infecções microbianas por não ocorrer hipertermia. São associadas principalmente à colite hemorrágica e, em casos mais graves, à Síndrome Hemolítica-Urêmica (SHU), que pode levar à falência renal e também à púrpura trombocitopênica trombótica, com possível envolvimento do sistema nervoso central, devido à produção de uma potente citotoxina, denominada shiga

toxina (*Stx*) (KAPER et al., 2004). Um número significativo das pessoas afetadas pela SHU (cerca de 30 %) sofre danos permanentes, que incluem insuficiência renal crônica, hipertensão e deficiências neurológicas, assim todas as cepas de EHEC são consideradas patogênicas (MORA et al, 2005).

Os fatores de virulência dos patotipos de *E. coli* possibilitam que se fixem as células epiteliais intestinais do hospedeiro por meio de fimbrias ou adesinas. Esta ligação leva a proliferação microbiana no trato intestinal, liberação das toxinas nos enterócitos e consequente sintomatologia característica (NGELEKA et al., 2003).

Existem diversos genes de virulência encontrados em infecções por EHEC e EPEC, e em sua maioria, estão relacionados à adesão na mucosa intestinal (GYLES, 2007).

Os fatores de virulência de estirpes de *E. coli* estão associadas a variedades cromossomais e genes plasmidais que codificam variedades de fatores de aderências intestinal, pili, antígenos capsulares, flagelos, enterotoxinas termolábeis e termoestáveis, produção de colicina, presença de aerobactina, resistência sérica entre outros, sendo estes fatores de virulência importantes indicadores de patogenicidade (VIEIRA, 2010).

O processo de adaptação das bactérias em novos ambientes é facilitado pela transferência horizontal de genes, o que colabora para a capacidade de aquisição de fatores de virulência envolvidos diretamente em infecções, podendo modificar a composição do material genético bacteriano drasticamente, pela incorporação de elementos genéticos de outros organismos (DAM e DAS, 2006).

Além de adaptações ao ambiente a transferência genética pode contribuir para a resistência aos antimicrobianos. As informações podem ser transportadas através dos integrons, esses são responsáveis pela transferência de resistência não só para a *E. coli*, mas também para outras espécies bacterianas, contribuindo, desta forma, para uma prevalência de resistência a infecções humanas (AJIBOYE et al., 2009).

Métodos de análises molecular têm sido utilizados para a identificação dos fatores de virulência associados às doenças ocasionadas por microrganismos. Dentre eles destaca-se a tecnologia baseada na Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) (GARCIA et al., 2008; ROCHA et al., 2008).

A PCR consiste em uma reação de amplificação *in vitro* do DNA pesquisado. A multiplicação é exponencial e se dá por meio da ação de uma enzima (DNA polimerase) que, tendo um segmento de DNA de fita simples como molde, é capaz de construir a fita complementar a esse segmento, através da polimerização de nucleotídeos adicionados ao sistema. O início da cópia se dá a partir de dois oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) complementares às extremidades 3'e 5'do fragmento do DNA a ser copiado (FRANCO e LANDGRAF, 2008; DE ROBERTIS e HIB, 2006).

O processo da PCR requer quatro componentes: dois *primers*, cada um consistindo em 15 a 20 bases de DNA, denominadas oligonucleotídeos, correspondendo a sequencias de DNA imediatamente adjacentes à sequência de interesse; DNA polimerase, que realiza o processo vital de replicação do DNA, sendo denominada extensão do *primer*; um grande número de nucleotídeos de DNA livres; DNA genômico de um indivíduo (JORDE et al., 2004).

Os produtos da PCR são analisados por meio de eletroforese, utilizando géis de agarose ou géis de poliacrilamida. Essas duas substâncias formam tramas de poros de tamanhos variáveis, possibilitando a separação dos fragmentos, que terá sua eficiência dependente da concentração do polímero e da intensidade da voltagem e amperagem aplicada (VIEIRA, 2009).

Uma vez identificada à contaminação, estratégias de controle devem ser tomadas para minimizar os riscos à saúde dos consumidores como, monitoramento do cultivo, boas práticas aquícolas e tecnologias pós captura como depuração e uso de substâncias bactericidas e bacteriostáticas.

## **Antimicrobianos**

Segundo a Organização Mundial da Saúde, o uso racional de antimicrobianos pode ser definido como aquele que maximiza os efeitos terapêuticos clínicos, enquanto minimiza tanto a toxicidade relacionada aos medicamentos, quanto o desenvolvimento da resistência antimicrobiana (BARBOSA et. al, 2008).

A resistência bacteriana aos antimicrobianos tem emergido como um problema mundialmente importante, fazendo com que muitas classes de antimicrobianos tenham se tornado menos efetivas nos últimos anos. Algumas

vezes, parte da emergência de resistência está relacionada ao uso intensivo ou inadequado desses compostos, ocasionando a seleção de patógenos resistentes (GALES et. al, 1997). Um estudo no Brasil mostrou que os grupos beta-lactâmicos são os antimicrobianos mais usados no tratamento para infecções em gado leiteiro, representando 38,22 % do total de dos antimicrobianos, seguido pelos aminoglicosídeos (25,19 %) e a tetraciclina (15,41 %) (NETTO et. al, 2005).

As indústrias de alimentos têm passado por constantes pressões dos consumidores para que sejam removidos os resíduos de antimicrobianos (CARVALHO, et. al, 2006). Os alimentos de origem animal são considerados importantes veículos de microrganismos carreando genes de resistência e conseqüentemente pode ocorrer transferência desses genes entre os microrganismos ali presentes (BARBOSA et. al, 2007).

A resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos pode ser uma característica natural de algumas espécies de bactérias ou podem ser adquiridas (TAVARES, 1990). Amplas variações na sensibilidade de diferentes estirpes podem ocorrer em uma mesma espécie bacteriana aos agentes antimicrobianos. Salienta-se que os antimicrobianos têm sido valiosos instrumentos na luta contra os microrganismos causadores de doenças, porém, muitos microrganismos adquiriram resistência aos agentes antimicrobianos usualmente utilizados (GILMAN et. al, 1996).

O uso descontrolado de antimicrobianos sintéticos tem sido responsável pelo surgimento de cepas microbianas progressivamente mais resistentes a diferentes compostos antimicrobianos (SOUZA, 2006). Tem-se verificado o aumento da resistência microbiana de cepas isoladas de alimentos, tais como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* e *Salmonella* frente a diferentes antimicrobianos de uso clínico, como ampicilina, bacitracina, cloranfenicol e cefalotina (BANERJEE e SAKKAR, 2004). Sendo assim, a resistência microbiana torna-se um importante impulsionador para a busca de novos constituintes antimicrobianos para a aplicação em alimentos. Baseado nos resultados observados *in vitro*, alguns autores tem se aprofundado nesta possibilidade (FEY et al., 2000; LAMBERT et al., 2001; MENDONÇA, 2004; KRUGER, 2006).

Diante o exposto, alternativas substitutivas aos antibacterianos são urgentemente requeridas, tais como os antimicrobianos naturais, que se

configuram como compostos adicionados ou presentes em alimentos com a função de retardar ou inibir o desenvolvimento microbiano, tais como os óleos essenciais (BRUGALLI, 2003; TIPPAYATUM e CHONHENCHOB, 2007).

### **Óleos essenciais**

Os óleos essenciais (OE) são produtos do metabolismo secundário das plantas e possuem composição química complexa, cujos componentes incluem hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, peróxidos, furanos, lactonas, ácidos orgânicos fixos, em diferentes concentrações, em que um desses compostos farmacologicamente ativo é majoritário, e estão relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência vegetal, exercendo papel fundamental na defesa contra microrganismos (SIMÕES e SPITZER, 2000; SIQUI et al., 2000, GONÇALVES et al., 2003).

O efeito antimicrobiano está relacionado, principalmente, à alteração da permeabilidade e integridade da membrana celular bacteriana (LAMBERT et al., 2001).

Usualmente os derivados de plantas são utilizados para acentuar gosto ou aroma de alguns alimentos, porém sua atividade antiviral, antiparasítica, antitoxigênica, antimicótica, inseticida, pesticida e antibacteriana, quando aplicados em alimentos, é pouco conhecida (BURT, 2004).

A composição dos OEs encontram-se em constante transformação, variando de acordo com a origem botânica, o quimiotipo, fatores ambientais, e o procedimento de plantio, cultivo e colheita das plantas, podendo variar também conforme a origem geográfica, época de colheita, tipo de adubação e secagem (BANDONI; CZEPAK, 2008).

A ausência de padrão na composição química dos OEs minimiza o risco de desenvolvimento de resistência microbiana. A combinação de componentes, que, apresentam diferentes mecanismos de atividade antimicrobiana, dificultando a adaptação dos microrganismos (DAFERERA et al., 2000).

Dentre os compostos antimicrobianos naturais atualmente estudados, destaca-se o óleo essencial de *Lippia origanoides* (Kunt), por apresentar potencial atividade antimicrobiana com amplo espectro de ação.

O gênero *Lippia* (família Verbenaceae) compreende cerca de 200 espécies de ervas, arbustos e pequenas árvores, com ampla disseminação na América do Sul, América Central e na África tropical (TERBLANCHÉ; KORNELIUS, 1996; PASCUAL et al., 2001). Os principais centros de diversidade específica do gênero *Lippia* se encontram no México e Brasil, onde o maior número de espécies estão na Cadeia do Espinhaço, localizada nos estados de Minas Gerais, Bahia e Goiás (OLIVEIRA et al., 2007).

*Lippia origanoides* ou salva de Marajó, alecrim de tabuleiro, alecrim pimenta, orégano do monte, como é popularmente conhecida é caracterizado por ser um arbusto aromático ou pequena árvore podendo atingir até 3 m de altura, as suas folhas são amplamente utilizadas como um tempero na culinária e na medicina tradicional (PASCUAL, 2001; OLIVEIRA et al., 2007, VEGA VELA et al., 2013).

No nordeste brasileiro, as espécies de *Lippia* são usadas na medicina popular para o tratamento de resfriados, gripes, bronquites e tosse. Na maioria das vezes, as partes empregadas são as folhas e flores na forma de infusão (MESA et al., 2009).

A sua semelhança olfativa com o orégano inspirou este nome aos botânicos Humboldt, Bonpland e Kunth. É a primeira das espécies brasileiras onde foi identificada a presença de timol nos óleos essenciais (MORAIS et al., 1972).

A composição química do óleo essencial obtido das folhas mostrou um elevado teor de monoterpenos oxigenados, mas com elevada variação nos constituintes químicos. Alguns quimiotipos foram propostos, baseados na quantidade relativa dos compostos principais:  $\alpha$  e  $\beta$  felandrenos, limoneno, carvacrol, timol, eucaliptol,  $\alpha$  felandreno, p-cimeno e éter metílico do timol (STASHENKO et al., 2010; VEGAVELA et al., 2013).

Dentre eles, destacam-se o carvacrol e timol por apresentarem atividade antimicrobiana ambas as substâncias parecem tornar a membrana da célula permeável, e é capaz de desintegrar a membrana externa de bactérias Gram-negativas (NOGUEIRA e MORAES, 2011; RIBEIRO et al. 2013)

Andrade et al., (2014) avaliaram a composição química e a ação antimicrobiana do óleo essencial de *Lippia origanoides*. Os ensaios demonstraram que o óleo essencial é rico em carvacrol (29 %) e timol (11 %), e todas amostras

testadas inibiram o crescimento de cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Salmonella choleraesuis* (ATTCC 10708).

Além da atividade antimicrobiana o óleo essencial de *Lippia* tem demonstrado propriedades de interesse epidemiológico, tais como a atividade inseticida contra o mosquito *Aedes aegypti* (CARVALHO et al., 2003; LIMA et al., 2013).

## REFERÊNCIAS

AGUDO, I. **Panorama da Malacocultura no Brasil**. Disponível em: <<http://www.conchasbrasil.org.br/materias/malacocultura/index.asp>>. Acesso em: 09/05/2012. 223-253. Ago. 2004. Acribia, Zaragoza, 519 f. 1996.

AKUTSU, R.C.; BOTELHO, R.A.; CAMARGO, E.B.; SÁVIO, K.E.O.; ARAÚJO, W.C. 2005. Adequação das boas práticas de fabricação em serviços de alimentação. **Revista de Nutrição**, v. 18, n. 3, p. 419-27.

AMSON, G.V.; HARACEMIV, S.M.C.; MASSON, M.L.; Levantamento de dados epidemiológicos relativos à ocorrências/ surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) no Estado do Paraná – Brasil, no período de 1978 a 2000. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v. 30, n. 6, p. 1139-1145, nov./dez., 2006.

BAHIA PESCA. 1994. **Perfil do setor pesqueiro** (litoral do Estado da Bahia). Salvador, Governo do Estado da Bahia, Secretaria da Agricultura, 75p.

BANERJEE, M.; SARKAR, P. Antibiotic resistance and susceptibility to some food preservative measures of spoilage and pathogenic micro-organisms from spices. **Food Microbiology**, v. 21, n. 3, p. 335-342, jun. 2004.

BARARDI, C.R.M.; SINCERO, T.C.M.; CORREA, A.A. Contaminação de moluscos bivalves por patógenos humanos. In: SILVA-SOUZA (org.). **Sanidade de organismos aquáticos no Brasil**. Maringa: Abrapoa, p. 95-117, 2006.

BARNABÉ, G. coord. 1996. Bases biológicas y ecológicas de la Acuicultura. Edotirial.

BARNES, R.D. **Zoologia dos invertebrados**. 4 ed. São Paulo: Livraria Roca, 1990. 1179 p.

BARRETO, N.S.E.; SOUSA, O.V. de; VIEIRA, R.H.S. dos F. Moluscos bivalves: Organismos Bioindicadores da Qualidade Microbiológica das Águas: Uma Revisão. **Rev. Bras. Higie. Sanid. Anim.** v. 2, n. 2, p. 17 -29, 2008.

BARROS, B.C.V. **Avaliação da qualidade sanitária do pescado Salgado seco comercializado nas feiras livres de Belém-PA**. 2009. 45p. Trabalho de Conclusão de Programa de Especialização em Veterinária de Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal – HIPOA. 2009. Universidade Castelo Branco. Belém.

BOAVENTURA A.O. et al. **Avaliação das atividades antifúngicas e antibacterianas do cravo-daíndia (*Syzygium aromaticum* L.)**, Anais do CNPq, 20 de Junho 2006, Belo Horizonte-MG.

BRANDINI, F.P; SILVA, A.S; PROENÇA, L.A.O. **Oceanografia e maricultura**. In: Aquicultura no Brasil. Brasília: CNPq, 2000. p.107-142.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC No12, de 2 de janeiro de 2001. **Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Poder Executivo, Brasília, DF. Seção 1. 10 jan. 2001.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura 2010**. 2010.



BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Instrução Normativa Interministerial Nº 7**, de 8 de maio de 2012. Diário Oficial. Brasília 09 de maio de 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. **Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, n. 7-E, 10 jan. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Análise epidemiológica dos surtos de Doenças Transmitidas por alimentos no Brasil**. Secretaria de Vigilância em Saúde, p.15, 2015. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br>>. Acesso em: 22 jan. 2015.

BURKHARDT, W; CALCI, K.V. Selective Accumulation May Account for Shellfish-Associated Viral Illness. **Applied and Environmental Microbiology**. Apr. 2000, Vol. 66, No. 4, p. 1375–1378.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in BUSATTA, C. et al. Evaluation of Origanum vulgare essential oil as antimicrobial agent in sausage. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 610-616, Oct/Dec. 2007.

CARVALHO, J.B. **Caracterização morfoestratigráfica do preenchimento sedimentar da Baía de Iguape, Bahia – Influência das variações eustáticas do nível do mar e atividades tectônicas recentes**. Salvador. 2000. 119p [Dissertação]. Universidade Federal da Bahia.

CHRISTO, W.S. **Biologia reprodutiva e ecologia de ostras do gênero Crassostrea sacco, 1897 na Baía de Guaratuba (Paraná: Brasil): um subsídio ao cultivo**. (Tese doutorado). Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 146 f. 2006.

CHUN, S.S.; VATTEM, D.A.; LIN, Y.T.; SHETTY, K. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Process Biochemistry**. v. 40, p. 809-816, 2005.

CLSI, 2003. Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, CLSI Document M7-A10, v. 10. Wayne: **Clinical and Laboratory Standard Institute**, 2003.

COELHO, C. et al. Hepatitis A virus detection in oysters (*Crassostrea gigas*) in Santa Catarina State, Brazil, by reverse transcription-polymerase chain reaction. **Journal of Food Protection**, v.66, n.3, p.507–511, 2003.

COOK, D.W. Microbiology of bivalves molluscan shellfish. In: Ward, D.R.; Hackney, C.(eds). **Microbiology of marine food products**. New York: Van Nostrand Reinhold, USA, cap.2, p. 19-34, 1991.

COOK, D.W.; BURKHARDT III. W.; DePAOLA, A.; McCARTHY, S.A.; CALCI, K. R. Molluscan shellfish: oyster, mussels and clams. In: DOWNES, F.P., ITO, K. (Ed.) **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4 ed. APHA: Washington, 2001. p.507-514.

COSTA, M.M. et al. Caracterização epidemiológica, molécula e perfil de resistência aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de criatórios suínos do sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.26, n.1, p.5-8 2006.

COSTA, R.A.; VIEIRA, G.H.F.; SILVA, G.C.; PEIXOTO, J.R.O.; BRITO, M.V. Bactérias de interesse sanitário em sushi comercializado em Sobral – Ceará. **Boletim Téc. Cient. CEPENE**. Tamandaré, v. 15, n. 1, p. 15-19, 2007.

CRUZ-ROMERO, M.; KERRY, J.P.; KELLY, A.L. Changes in the microbiological and physicochemical quality of high-pressure-treated oysters (*Crassostrea gigas*) during chilled storage. **Food Control**, v. 19, n. 12, p. 1139-1147, 2008.

DAFERERA, D. et al. GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic  
DEKSHENIEKS, M.M.; HOFMANN, E.E.; KLINCK, J.M. & POEWLL, E.N. 1999.  
Odeling the vertical distribution of oyster larvae in response to environmental  
conditions. **Mar. Ecol. Prog.**, 136 (1-3): 97-110.

DAM, T.; DAS, P. Plasmids-potential tool for the investigation of gene transfer n  
*Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n. 4, p.  
479-480, 2006.

DEKSHENIEKS, M.M., HOFMANN, E.E.; KLINCK, J.M. and POWELL, E.N.  
Quantifying the Effects of Environmental Variability on an Oyster Population Using  
a Coupled Oyster-Circulation Model. **Estuaries**, 23, 593-610. 1996.

DELGADO da SILVA, M.C.; NORMANDE, A.C.L.; FERREIRA, M.V.; RAMALHO,  
L.S. Avaliação da Qualidade Microbiológica de Pescado Comercializado em  
Maceió, AL. **Higiene Alimentar**, v.16, n. 96, p. 61-64, 2002.

DEVAKIE, M.N. & ALI, A.B. 2000. Effective use of plastic sheet as sustrate in  
CACCIONI, D.R.L.; GIZZARDI, M; BIONDI, D.M.; RENDA, A.; RUBERTO, G. -  
Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and  
antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. **International  
Journal Food Microbiology**, 43: 73-9, 1998. Disponível em:  
<<http://www.bahiapesca.ba.gov.br/aquicultura-maritima>>. Acesso em: 09 jan.  
2012.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture** 2010. Rome, 2010. 218p.

FEY, P. et al. Ceftriaxone-resistant salmonella infection acquired by a child from  
cattle. **New England Journal of Medicine**, v. 342, n. 17, p. 1242-1249, Apr 2000.

FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO), FAOSTAT Agriculture Data.  
Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em: 10 jan. 2016. foods - a review.  
**International Journal of Food Microbiology**. Holanda. v. 94, p.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. 182p.

FRASCESCHI, F.; CASTILHO, G.G.; OSTRENSKY, A.; BOEGER, W. Variação da concentração de bactérias fecais na carne de ostras do mangue (*Crassostrea rizophorae*) Guilding, 1828, coletadas em bancos naturais da Baía de Guaratuba, PR. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 23, n. 168-169, p. 106 - 110, 2009.

FRANCHI, M.; MENEGÁRIO, A.A.; BROSSI-GARCIA, A.L.; CHAGAS, G.C.; SILVA, M.V.; PIÃO, A.C.S.; GOVONE, J. S. Bioconcentration of Cd and Pb by the River Crab *Trichodactylus fluviatilis* (Crustacea: Decapoda), **J. Braz. Chem. Soc.**, 22, 230-238, 2011.

FREITAS, Fernanda. **Análise microbiológica, toxicológica e histopatológica de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) cultivadas na baía de Iguape**, Bahia. [2012] não publicado.

FURLAN, E.F. **Vida útil dos mexilhões perna perna cultivados no litoral norte de São Paulo: aferição dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos**. 2004. 106p. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2004.

GARCIA, P.M.; ARCURI, E.F.; BRITO, M.A.V.P.; LANGE, C.C.; BRITO, J.R.F.; CERQUEIRA, M.M.O.P. Detecção de *Escherichia coli* O157:H7 inoculada experimentalmente em amostras de leite cru por método convencional e PCR *multiplex*. **Arq. Bra. Méd. Vet. Zootec.**, v. 60, n. 5, p. 1241-1249, 2008.

GARCIA, A.N.; BARROSO, G. F. **Qualidade sanitária da água e do mexilhão *Perna Perna* na área de cultivo de Anchieta (ES)**. In: BARROSO, G.F.; POERSCH, L.H.S.; CAVALLI, R.O. Sistemas de cultivos aquícolas na zona costeira do Brasil: recursos, tecnologias, aspectos ambientais e sócioeconômicos. Rio de Janeiro: Museu Nacional, v.1, p. 243-250, 2007.

GENZ, F. Avaliação dos efeitos da Barragem Pedra do Cavalo sobre a circulação estuarina do rio Paraguaçu e Baía de Iguaçu. Salvador., **Tese**, 2006. 266p. [].

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S.; OLIVEIRA, C.A.S. Aspectos da qualidade do pescado de relevância em saúde pública. **Revista Higiene Alimentar**, n. 53, v. 12, p. 30-37, 1998.

GESAMP (IMO/FAO/UNESCO-IOC/WMO/WHO/IAEA/UN/UNEP Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection), Towards safe and effective use of chemicals in coastal aquaculture. **Rep.Stud.GESAMP**, (65):40p. 1997.

GOMES, R.S. Diagnóstico socioeconômico das marisqueiras da mangabeira que participam do projeto de ostreicultura comunitário da Fundação Alphaville, Eusébio - Ceará. 2006. 52p. **Monografia (Engenharia de Pesca)** - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, CE, 2008.

GONÇALVES, L.A. et al. Produção e composição do óleo essencial de alfavaquinha (*Ocimum selloi* Benth.) em resposta a dois níveis de radiação solar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucavu, v. 6, n. 1, p. 8-14. 2003.

GUIMARÃES, S. S. et al. Indução de fitoalexinas em cotilédones de soja (*glycine max*) em resposta a derivados de capítulos florais de cravo-da-índia (*syzygium aromaticum* l.). **Ciência Rural**. Paraná, v.38, n.7, out. 2008.

GYLES, C.L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. **Journal of Animal Science**, v. 85, p. 45-62, 2007.

HARRINGTON, S.M.; DUDLEY, E.G.; NATARO, J.P. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **FEMS Microbiol Lett**, v.254, n.1, p.12-8, 2005.

HUANG, D.B; MOHANTY, A.; DUPONT, H.L.; OKHUYSEN, P.C. e CHIANG, T.A. Review of an emerging enteric pathogen: enteroaggregative *Escherichia coli*. **J. Clin. Microbiol**, v. 55, p. 1303-1311, 2006.

HUSS, H.H. **Garantia da qualidade dos produtos da pesca**. FAO. Documento Técnico sobre as Pescas. n. 334. Roma: FAO. 1997. 176 p.

IBAMA. **Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis**. Estatística da Pesca, 2005. Brasília, DF, 2005. 115 p.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). Microorganisms in Foods 6: **Microbial Ecology of Food Commodities**. 2. ed., New York: Springer, 2005.

JAY, J.M. **Microbiologia de Alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2005. 711p.

JORDE, L.B.; CAREY, J.C.; BAMSHAD, M.J.; WHITE, R.L. **Genética médica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. 415p.

KAPER, J.B.; NATARO, J.D.; MOBLEY, H.L.T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews**, London, v. 2, p. 123-139, 2004.

KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nat Rev Microbiol**, v.2, n.2, Feb, p.123-40, 2004.

KITTIGUL, L.; POMBUBPA, K.; RATTANATHAM, T.; DIRAPHAT, P.; UTRARACHKIJ, F.; PUNGCHITTON, S.; KHAMRIN, P.; USHIJIMA, H. Development of a method for concentrating and detecting rotavirus in oysters. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam: Elsevier, v. 122, n.1-2, p. 204-210, 2008.

KOTZEKIDOU, P.; GIANNAKIDIS, P.; BOULAMATSIS, A.; Antimicrobial activity of some plant extracts and essential oils against food borne pathogens in vitro and

on the fate of inoculated pathogens in chocolate. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie, Food Science and Technology**. n 41(1):119-127. 2008.

KRUGER, M.F. Controle de *Listeria monocytogenes* em lingüiça frescal refrigerada através do uso de óleo essencial de orégano e nisina. 2006. 74f. **Dissertação** (Pós graduação em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2006.

KUNICKA-STYCZYN, A.; SIKORA, M.; KALEMBA, D. Antimicrobial activity of lavender, tea tree and lemon oils in cosmetic preservative systems. **Journal of Applied Microbiology**. n. 107, p. 1903–1911. 2009.

LAMBERT, R.J.W.; SKANDAMIS, P.N.; COOTE, P.J.; NYCHAS, G. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of oregano essential oil, thymol and carvacol. **Journal of Applied Microbiology**. v.91, n.453-462. 2001.

. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of oregano essential oil, thymol and carvacol. **Journal of Applied Microbiology**.v.91, n.453-462. 2001.

LEAL, D.A.G.; FRANCO, R.M.B. Moluscos bivalves destinados ao consumo humano como vetores de protozoários patogênicos: metodologias de detecção e normas de controle. **Revista Panamericana de Infectologia**, São Paulo, v. 10, n. 4, p. 48-57, 2008.

LEE, R. J & YOUNGER, A.D. Determination of the relationship between faecal indicator concentrations and the presence of human pathogenic micro-organisms in shellfish. **Molluscan Shellfish Safety**, Galicia: Grafinova S.A., p. 247-252, 2003.

LEE, R., LOVATELLI, A.; ABABOUC, L. **Bivalve depuration: fundamental and practical aspects**. FAO Fisheries Technical Paper. Rome, 2008.

LENOCH, R. Saúde Pública e Moluscos Marinhos Cultivados. **Gerenciamento Costeiro Integrado**, UNIVALI, Itajai/SC, v. 3, p. 15 - 17, 2004.

MAMEDE, T.C.A. Biomonitoramento por *Crassostrea rhizophorae* (guilding, 1928) e percepção de risco socioambiental na Baía de Todos os Santos, Bahia. Salvador. **Dissertação**. Universidade Federal da Bahia. 2012.

MARINO, M. et. al., Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67, n.3, p. 187-195. 2001.

MENDONÇA, A.T. Efeito dos óleos essenciais de condimentos sobre o crescimento de *S. aureus* em ricota cremosa. 72f. 2004. **Tese** (Pós-graduação em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras. Lavras. Minas Gerais. 2004.

MIOSSEC, L.; LE DEUFF, R-M.; GOULLETQUER, P. Alien species alert: *Crassostrea gigas* (Pacific oyster). ICES **Cooperative Research Report**, Copenhagen, n. 299, 2009. 42 p.

MORA, A.; BLANCO, J. E.; BLANCO, M.; ALONSO, M. P.; DHABI, G.; ECHEITA, A.; GONZÁLEZ, E. A.; BERNÁRDEZ, M. I.; BLANCO, J. Antimicrobial resistance of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 strains isolated from humans, cattle, sheep and food in Spain. **Research in Microbiology**, v. 156, p. 793-806, 2005.

MORAES, I.R.; MASTRO, N.L.; JAKABI, M.; GELLI, D.S. Estudo da radiosensibilidade ao 60° CO do *Vibrio cholerae* incorporado em ostras. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 34, n° 1, 2000.

MPA. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura 2010**. Ministério da Pesca e Aquicultura. Brasília. 2012. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/index.php/topicos/300-boletim-estatistico-da-pesca-e-aquicultura-2010>>. n. 6, p. 2576-81, Jun. 2000.



NAYLOR R. L.; GOLDBURG R. J.; PRIMAVERA J. H.; KAUTSKY N.; BEVERIDGE M. C. M.; CLAY J.; FOLKE C.; LUBCHENCO J.; MOONEY H.; TROELL M. Effect of aquaculture on world fish supplies. **Nature**, v. 405, p. 1017-1024, 2000.

NAKAZATO, G.; CAMPOS, T.A.; STEHLING, E.G.; BROCCHI, M.; SILVEIRA, W.D. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 7, p. 479-486, 2009.

NATARO, J.; KAPER, J. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 1, p. 142 - 201, 1998.

NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin Microbiol Rev**, v.11, n.1, p.142-201, 1998.

NGELEKA, M.; PRITCHARD, J.; APPELYARD, G.; MIDDLETON, D.; FAIRBROTHER, J. Isolation and association of *Escherichia coli* AIDA-I/STb, rather than EAST1 pathotype, with diarrhea in piglets and antibiotic sensitivity of isolates. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 15, n. 3, p. 242- 252, 2003.

NOSTRO, A. et al. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. **Fems Microbiology Letters**, v. 230, n. 2, p. 191-195, Jan. 2004.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE - OPAS. **Guias para o gerenciamento dos riscos sanitários em alimentos**. Rio de Janeiro: Área de Vigilância Sanitária, Prevenção e Controle de Doenças - OPAS/OMS, 2009.

PACHECO, T.A.; LEITE, R.G.M.; ALMEIDA, A.C.; SILVA, N.M.O.; FIORINI, J.E. Análise de coliformes e bactérias mesófilas em pescado de água doce. **Revista Higiene Alimentar**, v. 18, n. 116/117, p. 68-72, 2004.

PEREIRA, C.S. **A cultura de mexilhões na Baía de Guanabara e suas implicações para a Saúde Pública** – Contexto político-social e microbiológico. Rio de Janeiro: ENSP, 2003.[Tese].

PEREIRA, O.M.; HENRIQUES, M.B.; FACUNDES, L. Viabilidade da criação de ostra *Crassostrea gigas* no litoral das regiões sudeste e sul do Brasil. *Bol. Inst. Pesca*, 26(1), p. 7- 21, 1998. plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. **J. Agric Food Chem**, v. 48.

PEREIRA, M.A.; NUNES, M.M.; NUERNBERG, L.; SCHULZ, D.; BATISTA, C.R.V. Microbiological quality of oysters (*Crassostrea gigas*) produced and commercialized in the coastal region of Florianopolis – Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, p. 159-163, 2006.

POTASMAN, I.; PAZ, A.; ODEH, M.; Infectious outbreaks associated with bivalve shellfish consumption: a worldwide perspective. **Clinical Infectious Diseases**. Chicago, v. 35, n. 8 p. 921-928, 2002.

PROST, C. Impactos territoriais e ambientais Efeitos da barragem da Pedra do Cavalo sobre a pesca artesanal na baía do Iguape. **I Encontro latinoamericano de Ciencias sociales y represas e II encontro Brasileiro de Ciências sociais e barragens**. Salvador/Bahia, 2007.

REHDER, V.L.G.; MACHADO, A.L.M.; DELARMELINA, C.; SARTORATTO, A.; FIGUEIRA, G.M.; DUARTE, M.C.T. Composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Origanum applii* e *Origanum vulgare*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.6, n.2, p.67-71, 2004.

RIBEIRO, A.L.M.S.; OLIVEIRA, G.M.; FERREIRA, V.M.; PEREIRA, M.M.D.; SILVA, P.P.O. Avaliação microbiológica da qualidade do pescado processado, importado no estado do Rio de Janeiro. **R. bras. Ci. Vet.**, v. 16, n. 3, p. 109-112, 2009.

RISTORI, C.A.; SEBASTIÃO T.I.; GELLI D.S.; RIVERA, G.I.N. Pathogenic bacteria associated with oysters (*Crassostrea brasiliana*) and estuarine water along the south coast of Brazil. **International Journal of Environmental Health Research.**; 17(4): 259 – 269. August 2007.

RISTORI, C.A.; IARIA, S.T.; GELLI, D.S.; RIVERA, I.N.G. Pathogenic bacteria associated with oysters (*Crassostrea brasiliana*) and estuarine water along the south coast of Brazil. **International Journal of Environmental Health Research**, v. 17, p. 259-269, 2007.

ROBBERS J.E. et al. **Farmacognosia e Farmacobiotechnologia**. Editorial Premier, São Paulo-SP, 1997.

ROCHA, A.C.G.P.; ROCHA, S.L.S.; LIMA-ROSA, C.A.V.; SOUZA, G.F.; MORAES, H.L.S.; SALLE, F.O.; MORAES, L.B.; SALLE, C.T.P. Genes associated with pathogenicity of avian *Escherichia coli* (APEC) isolated from respiratory cases of poultry. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 3, p. 183-186, 2008.

RODRIGUESZ-ANGELES, G. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. **Salud pública de México**, v. 44, n. 5, p. 464-475, 2002.

RODRIGUES, L.A.P.; CARVALHO FILHO, C.D. Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* nas Etapas de Beneficiamento de Ostras (*Crassostrea rhizophorae*), Cultivadas na Baía de Todos os Santos - BA, e Determinação dos Pontos Críticos de Controle. UNOPAR. **Cient Ciênc Biol Saúde**, v. 13, n. 2, p. 77-83, 2011.

RUPP, G.S. **Introdução à biologia das ostras**. In: FERREIRA, J.F. et al. Cultivo de ostras. Laboratório de cultivo de moluscos marinhos. Florianópolis. p. 15-24, 1999.

RUPP, G.S.; de OLIVEIRA NETO.; F. M. Y GUZENSKI, J. **Estado actual del cultivo de moluscos bivalvos en la región sudeste -sur de Brasil**. In:

LOVATELLI, A.; FARÍAS, A.; URIARTE, I. Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Roma: FAO, 2008. p. 77–89.

SAHIN, F.; GULLUCE, M.; DAFERERA, D.; SOKMEN, A.; SOKMEN, M.; POLISSIOU, M.; et al. **Food Control**. 56: 2-9, 2003.

SANDE, D.; MELO, T.A.; OLIVEIRA, G.S.A.; BARRETO, L.; TALBOT, T.; BOEHS, G.; ANDRIOLI, J.L. Prospecção de moluscos bivalves no estudo da poluição dos rios Cachoeira e Santana em Ilhéus, Bahia, Brasil. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 47, n. 3, p. 190-196, 2010.

SCPI Newroom. **Center for Science in the Public Interest. Seafood is Leading Cause of Foodborne Illness Outbreaks**. Release: October 24, 2001.

SECRETARIA ESPECIAL DE AQUICULTURA E PESCA DA PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA - SEAP. 2004. **National Aquaculture Sector Overviews and prospective analysis of future aquaculture development (PAFAD)**. Organizado por F. Suplicy. Brasília (DF).

SILVA, A.I.M.; VIEIRA, R.H.S.M.; MENEZES, F.G.R.; FONTELES-FILHO, A.A.; TORRES, R.C.O.; SANT'ANNA, E.S. Bacteria of fecal origin in mangrove oysters (*Crassostrea rhizophorae*) in the Coco river estuary, Ceara State, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 34, p. 126-130, 2003.

SILVA, M.I.G.; MELO, C.T.V.; VASCONCELOS, L.F.; CARVALHO, A.M.R.; SOUZA, F.C.F.; 2014. Bioactivity and potential therapeutic benefits of some medicinal plants from the Caatinga (semi-arid) vegetation of Northeast Brazil: a review of the literature. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n.1, p. 193-207.

SILVA, A.I.M. et al. Bacteria of fecal origin, in mangrove oysters (*Crassostrea rhizophorae*) in the Cocó River estuary, Ceará State, Brazil . **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 1-2, p. 126-130, 2004.

SILVA, A.I.M.; VIEIRA, R.H.S.M.; MENEZES, F.G.R.; FONTELES-FILHO, A.A.; TORRES, R.C.O.; SANT'ANNA, E.S. Bacteria of fecal origin in mangrove oysters (*Crassostrea rhizophorae*) in the Cocó river estuary, Ceará State, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 126-130, 2003.

SILVA, C.C.; SILVA, J.C. **Dossiê Técnico**. Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas – SBRT. 2007. Disponível em: <<http://www.respostatecnica.org.br>> Acesso em: 07 mai. 2014.

SILVA, M.C.; RESENDE, C.S.M. **Perecibilidade de pescados: aspectos sensoriais, microbiológicos e físico-químicos**. Programa De Pós-Graduação Em Ciência Animal [Seminário]. Universidade Federal de Goiás. 2010.

SIQUI, A.C. Óleos essenciais - potencial antiinflamatório. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**. v. 16, p. 38-43, 2000.

SKANDAMIS, P.; TSIGARIDA, E.; NYCHAS, G.J.E. The effect of oregano essential oil on survival /death of *Salmonella typhimurium* in meat stored at 5°C under aerobic, VP/MAP conditions. **Food Microbiology**. v. 19, p. 97-103, 2002.

SOUZA, E.L. Potencial antimicrobiano do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.): uma abordagem para uso em sistemas de conservação de alimentos. Recife. **Tese**. Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, 2006.

SOUZA, E.L.; STAMFORD, T.L.M.; LIMA, E.O.; TRAJANO, V.N.; BARBOSA FILHO, J.M. Antimicrobial Effectiveness of Spices: an Approach for Use In Food Conservation Systems. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, vol.48, n. 4: 549-558p. Jul. 2005.

TIPPAYATUM, P.; CHONHENCHOB, V. Antibacterial effect of essential oil compounds and nisin to food spoilage bacteria. **Kasetsart Journal** . v. 41, n.5, p. 319-323. 2007.

VARGAS, D.S.T.; QUINTAES, K.D. Potencial perigo microbiológico resultante do uso de caixas plásticas tipo monobloco, no armazenamento e transporte de pescados em São Paulo. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 23(3), p. 517-522, set./dez. 2003.

VIEIRA, D.P. Técnicas de PCR: aplicações e padronização de reações. **Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 2010. Disponível em: <<http://www.imtsp.fm.usp.br/Proto/protocol.html>>. Acesso em: 17 jan. 2016.

VIEIRA, R.H.S.F. Microbiologia do Pescado. In: GONÇALVES, A.A. **Tecnologia do Pescado: Ciência, Tecnologia, Inovação e Legislação**. São Paulo: Editora Atheneu, p. 33 - 42, 2011.

VIEIRA, R.H.S.F.; REBOUCAS, R.H.; ALBUQUERQUE, W. *Staphylococcus* coagulase positiva em camarão sete barbas *Alpheidae kroyeri* comercializado na feira livre de pescado do Mucuripe-Fortaleza-CE. **Boletim Técnico Científico do CEPENE**, Recife, v. 14, p. 11-22, 2006.

WHEATON, F. Review of the properties of Eastern oysters, *Crassostrea virginica*: Part I- Physical properties. **Aquacultural Engineering**, v. 37, p. 3–13, 2007.

WILLIAMS, D.N.; TORRES, A.G.; LLOYD, S.J. **Evolution and Epidemiology of Diarrheagenic *Escherichia coli***, in: Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America. p.8-24, 2010.

## **CAPÍTULO 2**

### ***Escherichia coli* EM OSTRAS E ÁGUA DE CULTIVO DA BAIA DO IGUAPE-BAHIA: OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA**

Artigo a ser submetido ao Journal of Microbiology (Impresso)

# ***Escherichia coli* EM OSTRAS E ÁGUA DE CULTIVO DA BAIÁ DO IGUAPE-BAHIA: OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA**

Gabrielly Sobral Neiva<sup>(1)</sup>, Isabella de Matos Mendes da Silva<sup>(2)</sup>, Fernanda Freitas<sup>(2)</sup> e Livia Souza Guimarães Rocha e Silva<sup>(1)</sup>

1 - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia- Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. Rua Rui Barbosa, 710 - Campus Universitário CEP 44380-000, Cruz das Almas/BA. neiva.gs@hotmail.com/ (75) 8826-2426.

2 - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia- Centro de Ciências da Saúde, Avenida Carlos Amaral, 1015 - Cajueiro, Santo Antônio de Jesus/BA, CEP 44.570-000.

## **RESUMO**

O consumo de ostras cruas esta associado ao surgimento de Doenças de Transmissão Alimentar, devido principalmente, a característica de bioacumular partículas presente no ambiente, propiciando a contaminação por microrganismos patógenos, como *Escherichia coli*. Deste modo, o objetivo do presente estudo foi determinar a qualidade microbiológica de ostras *Crassostrea rhizophorae* e água de cultivo da Reserva Extrativista Marinha Baía do Iguape - Bahia e caracterizar genotípicamente *Escherichia coli* isoladas dessas amostras. Foram realizadas quatro coletas em três pontos distintos, no período de janeiro a abril de 2015. Para análise da água utilizou-se da técnica do Número Mais Provável - NMP/100 mL com série de cinco tubos em três diluições e a determinação da população de Coliformes Totais (CT) e *E. coli* em ostras foi realizada por meio de método rápido de contagem em placas Petrifilm™ EC (3M Company) AOAC 998.08. As amostras de água apresentaram contagem microbiana média de 1,30 log NMP/100 mL para CT e 2,45 log NMP/100 mL, para coliformes termotolerante, variando entre de 0,83 a 2,08 log NMP/100 mL e 0,66 a 6,80 log NMP/100 mL, respectivamente. A análise microbiológica de ostra evidenciou valores contagem de CT de 0,95 a 4,76 log UFC/g e *E. coli* 0,95 a 6,80 log UFC/g. A caracterização genotípica dos isolados identificou o gene de virulência *stx*/EHEC em 36,6 % (11/30) das amostras analisadas. Nenhuma das amostras estudadas apresentou



o gene de virulência *bfpA*/EPEC. Apesar dos resultados encontram-se de acordo com os padrões estabelecidos pela legislação internacional, o gene de virulência identificado em parte das amostras analisadas sugere cuidado quanto ao consumo das ostras cultivadas neste local. Recomenda-se que a área escolhida para o cultivo seja livre ou controlada de poluição. A produção de ostras cultivadas depende fortemente das condições ambientais da área onde são cultivadas ou extraídas, destaca-se monitoramento contínuo dessas áreas.

**Palavras-chave:** Contaminação bacteriana, moluscos bivalves, poluição ambiental.

## ABSTRACT

The consumption of raw oysters that associated with the emergence of foodborne illnesses due mainly to the characteristic of particles bioaccumulate in the environment, leading to contamination by pathogenic microorganisms, such as *Escherichia coli*. Thus, the aim of this study was to determine the microbiological quality of *Crassostrea rhizophorae* and cultivation water of Reserve Marine Extractive Baía do Iguape - Bahia and characterize genotypically *Escherichia coli* isolated from these samples. Four samples were taken at three different points in the period January to April 2015. For analysis of the water was used the technique of the Most Probable Number - MPN/100 mL with five tubes in three dilutions series and the determination of the population Total coliforms (TC) and *E. coli* in oysters was performed by rapid method of count Petrifilm™ EC plates (3M Company) AOAC 998.08. Water samples had a mean microbial count of 1.30 log MPN/100 mL for CT and 2.45 log MPN/100 mL to thermotolerant coliforms, ranging from 0.83 to 2.08 log MPN /100 mL and 0.66 to 6.80 log MPN/100 mL, respectively. The Oyster microbiological analysis showed CT count values from 0.95 to 4.76 log UFC/g and *E. coli* from 0.95 to 6.80 log UFC/g. Genotypic characterization of isolates identified the virulence gene *stx*/EHEC in 36.6% (11/30) of the samples. None of the samples showed the virulence gene *bfpA*/EPEC. Although the results are in accordance with the standards established by international law, the virulence gene identified in part of the samples suggests careful about consumption of oysters grown in this location. It is recommended that the area selected for cultivation are free of pollution or controlled. The production of oysters grown strongly depends on the environmental conditions of

the area where they are grown or extracted, it stands out continuous monitoring of these areas.

**Keywords:** Contamination bacterial, bivalve Mollusks, environment pollution.

## INTRODUÇÃO

O consumo de organismos aquáticos originários de águas contaminadas pode levar ao aparecimento de doenças transmitidas por alimentos (DTA) que podem ser causadas tanto pela ingestão de alimento contaminado por agente biológico, como pela toxina por ele produzida no alimento (Brasil, 2001).

Os ambientes estuarinos estão sujeitos a distintos tipos de contaminação, como a veiculação microbiológica originária principalmente pelos efluentes domésticos lançados sem tratamento no ambiente, que podem causar riscos à saúde humana e às espécies presentes no hábitat, como a ostra (Barros e Barbieri, 2012).

A qualidade microbiológica da água influencia diretamente na qualidade dos moluscos cultivados, principalmente quando estes são ingeridos como alimentos em sua forma in natura (Mujika, 2013).

As ostras possuem fisiologia filtradora que se alimentam das partículas e microalgas que se encontram na água e acumulam, em seus tecidos, grandes quantidades de substâncias orgânicas, inorgânicas, além dos microrganismos presentes no ambiente, atuando como bioindicadores ambientais (Pereira et al., 2006; Zanette et al., 2006).

A presença de microrganismo do grupo dos coliformes no ambiente e nos animais cultivados indica contaminação fecal, devido à característica desse grupo de desenvolverem no trato gastrointestinal de animais de sangue quente. Assim, a contagem desses microrganismos é utilizada no monitoramento da qualidade microbiológica da água e do alimento (Silva et al., 2006; Codex, 2008).

A presença de *E. coli* é um indicativo de contaminação fecal recente ou de condições higiênicossanitárias insatisfatórias durante o processamento de alimentos (Silva et al., 2006).

Assim, o objetivo do trabalho foi determinar a qualidade microbiológica de ostras *Crassostrea rhizophorae* e água de cultivo da Reserva Extrativista Marinha

da Baía do Iguape-Bahia e caracterizar genotípicamente os isolados de *Escherichia coli* dos isolados.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Área de Estudo**

O estudo foi desenvolvido no setor norte da Reserva Extrativista Marinha Baía do Iguape (BI), município de Cachoeira – BA, abrangendo três comunidades que fazem parte do núcleo produtivo de ostreicultura: Dendê, Calembá e Engenho da Ponte.

### **Dados Pluviométricos**

Os dados de precipitação de chuva, somatório da semana anterior à coleta, foram obtidos do site do Programa de Monitoramento em Tempo Real da Região Nordeste do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE).

### **Coleta de Amostras**

Foram utilizadas para o experimento ostras da espécie *Crassostrea rhizophorae* cultivadas em cativeteiro no sistema travesseiro e água do cultivo. Esses moluscos foram coletados em períodos chuvosos e de estiagem, com a finalidade de observar as flutuações na população bacteriana das ostras e da água.

As coletas ocorreram mensalmente durante o período de janeiro a abril de 2015, totalizando quatro coletas. Em cada coleta foram amostradas dez ostras de cada de três pontos distintos de cultivo identificados como A, B e C. As ostras foram coletadas diretamente dos travesseiros e acondicionadas em sacos plásticos de primeiro uso e identificadas.

Concomitantemente as coletas de ostras ocorreram coleta das amostras de água de cultivo. As amostras foram compostas de água estuarina superficial com aproximadamente 30 cm de profundidade, colhidas em frascos estéreis por imersão, tomando como base o comprimento do braço e a linha da água acima do cotovelo.

Todas as amostras coletadas foram mantidas em caixa térmica contendo gelo reciclável e encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia do Núcleo de Segurança Alimentar e Nutricional (SANUTRI) do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, localizado em Santo Antônio de Jesus, Bahia. O tempo total entre coleta e análise das amostras não ultrapassou quatro horas.

### **Análise microbiológica da água de cultivo**

A qualidade microbiológica da água foi determinada pela população de coliformes totais e coliformes termotolerantes por meio da técnica do Número Mais Provável - NMP/100 mL com série de cinco tubos em três diluições distintas (10 mL, 1 mL e 0,1 mL) (Blodgett, 2010).

Inicialmente foi realizado o teste presuntivo. As amostras de água foram previamente homogeneizadas os volumes determinados foram transferidos para os tubos contendo Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) e contendo um tubo de Durhan invertido para coleta de gás. Foram considerados positivos os tubos que apresentarem turvação e formação de gás retida dentro do tubo de Durhan.

Posteriormente, foi realizado o teste confirmativo, com auxílio da alça de platina transferiu-se uma alíquota dos tubos presuntivos positivos para tubos contendo 10 mL caldo *Escherichia coli* (EC) e verde brilhante (VB). Os tubos de VB foram incubados a  $35\pm 1$  °C por  $24\pm 2$ h e os tubos de EC foram incubados em banho maria a  $44,5\pm 1$  °C por  $24\pm 1$ h. Foram considerados positivos os tubos que apresentaram turvação e produção de gás retido nos tubos de Durhan, e os resultados estabelecidos segundo a tabela de NMP.

As amostras positivas foram semeadas em placa de Petri contendo ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) e os isolados foram estocados em caldo BHI com glicerol a 20 % e mantidos a -20 °C para posterior extração do DNA bacteriano e realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

### **Análise microbiológica de ostra**

As populações de coliformes totais e *Escherichia coli* foram determinadas pelo método de contagem rápida Petrifilm™ (3M Company), utilizando placas EC (AOAC 998.08), conforme orientações do fabricante. A contagem das colônias foi

realizada com o auxílio de contador modelo CP600 Plus (Phoenix ®), sendo consideradas colônias típicas de *Escherichia coli* as colônias que apresentavam coloração azul ou vermelho-azuladas associadas a gás retido e coliformes totais colônias vermelho escuro, somadas as colônias características de *E. coli*.

As ostras foram lavadas em água esterilizadas com auxílio de escovas para retirada das sujidades, em seguida abertas por inserção de facas estéreis no arco das valvas.

Para a análise, foi adicionado 1 g da amostra devidamente homogeneizada em 9 mL de solução salina a 0,9 % de NaCl. Em seguida inoculou 1 mL em uma placa rotulada com código da amostra, data e diluição correspondente. As placas foram incubadas a  $35 \pm 1$  °C por  $24 \pm 2$  h, foram selecionadas para contagem as placas entre 25 a 250 colônias.

Os isolados foram estocados em caldo *Brain and Heart Infusion* (BHI) com glicerol a 20 % e mantidos a -20° C para posterior extração do DNA bacteriano e realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

### **Caracterização genotípica dos isolados de *E. coli***

Para extração do DNA, foi coletado 1 mL da suspensão bacteriana em caldo BHI após descongelamento por 24h a 37 °C e centrifugado por 5 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e adicionados 800 µL de água ultra pura. Após homogeneização, as amostras foram submetidas a uma nova centrifugação nas mesmas condições mencionadas anteriormente. O sobrenadante foi descartado e 80 µL de água ultra pura adicionada. Após essa etapa, as amostras foram submetidas à temperatura de 96 °C por dez minutos. Foi retirado 2 µL sobrenadante e transferido para um microtubo de polipropileno contendo 18 µL de água ultrapura e mantido congelado a -20 °C até o momento da análise.

A concentração do DNA foi quantificada por meio de espectrofotômetro BioPhotometer D30 (Eppendorf™). A concentração final foi ajustada utilizando água ultrapura (Hexapur™) para padronização em 50 ng/10µL.

O DNA extraído das cepas de *Escherichia coli* isoladas foi submetido à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para identificação de genes de virulência associados aos patotipos EHEC (*stx*) e EPEC (*bfpA*).

Para os controles positivos foram utilizadas cepas padrões cedidas pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) do Rio de Janeiro, de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (ATCC 43895) e enteropatogênica (EPEC) (CDC O111ab).

As condições da PCR, a sequência dos *primers* e o tamanho do fragmento amplificado de cada gene estudado estão descritos no Quadro 1.

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Veriti Thermal Cycler PCR (Applied Biosystems).

Para cada reação foram utilizados os seguintes reagentes e volumes: 1,5 µL de DNA; 5,0 µL de DNA buffer; 3,0 µL de MgCl<sub>2</sub>; 2,5 µL de dNTPs; 1,5 µL de iniciador 1 e 2; 0,4 µL de Taq DNA polimerase, o volume final ajustado para 25 µL com água ultra pura.

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio (1µg/mL) utilizando o equipamento *Eletroforesis Power supply EV243<sup>TM</sup>*-Consort.

Quadro 1. Sequência dos *primers*, tamanho dos fragmentos amplificados para detecção de genes associados à virulência de *E. coli*.

Gene/ Patotipo	Sequencia do primer 5´ - 3´	Condições da PCR	TF* (pb)
<i>stx</i> /EHEC	TTT ACG ATA GAC TTC TCG AC CAC ATA TAA ATT ATT TCG CTC	5 min, 94 °C; 35 ciclos de 1 min 94 °C; 3 min 48 °C; 4 min 72 °C; 10 min 72 °C.	227
<i>bfpA</i> /EPEC	AAT GGT GCT TGC GCT TGC TGC GCC GCT TTA TCC AAC CTG GTA	5 min 94 °C; 29 ciclos de 30 seg 94 °C; 1 min 56 °C; 2 min 72 °C; 10 min 72 °C.	330

Fonte: SILVA et al. (2011). \*TF = tamanho do fragmento.

### Análise Estatística

Foram calculadas as médias e desvio padrão das contagens de microrganismos encontradas. A média das bactérias foram submetidas a análise de variância (ANOVA) e comparados pelo teste de Tuckey em relação à variação entre os pontos de cultivo. Valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados significantes.

A correlação entre os achados de contagem microbiológica com os valores de precipitação de chuva foi calculada através do teste de correlação de Pearson, sendo considerados significativos os valores de  $p \leq 0,05$ .

Os dados foram analisados por meio do Software SPSS versão 20.0.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise microbiológica da água de cultivo permitiu verificar que a contagem de coliformes totais variou de 0,66 a 2,08 log NMP/100 mL e para coliformes termotolerantes de 1,05 a 6,80 log NMP/100 mL sendo os valores médios de 1,30 log/ log NMP/100 mL e 2,45 log NMP/100 mL, respectivamente. Os valores da contagem microbiana por ponto de coleta podem ser observados na tabela 1.

Tabela 1. Resultados das análises microbiológicas (log UFC/g) de água de cultivo coletadas em três pontos distintos da Reserva Extrativista Marinha Baía do Iguape, Bahia, 2015.

Mês de coleta	Pluviosidade (mm)	PONTO A		PONTO B		PONTO C	
		Ct (log NMP/100 mL)	CT	Ct (log NMP/100 mL)	CT	Ct (log NMP/100 mL)	CT
janeiro	3,47	0,66	1,05	0,83	1,34	0,66	1,05
fevereiro	66,82	0,83	1,34	0,90	1,80	0,90	1,43
março	204,6	0,83	4,50	2,08	6,80	1,43	6,80
abril	5,45	0,89	1,34	1,56	1,56	1,60	2,08

Fonte: Dados da pesquisa. Ct: Coliformes totais CT: Coliformes termotolerantes.

Achados de contaminação de coliformes totais e termotolerantes encontrados nestas áreas costeira relacionam-se com dos despejos de efluentes humanos, o que é considerado a principal causa de contaminação das águas.

A contagem de coliformes totais em ostras (CT) variou de 0,95 a 4,76 log UFC/g e a contagem de *E. coli* variou 0,95 a 6,80 log UFC/g entre os três pontos analisados. Os valores das médias da contagem microbiana por ponto de coleta podem ser observados na tabela 2.

Em estudo semelhante realizado por Evangelista-Barreto et al. (2014) ao analisar ostras *Crassostrea rhizophorae in natura* cultivadas no município de Maragogipe, na Baía do Iguape, nos períodos seco e chuvoso, verificou contagem de CT variando 3,34 a 6,11 log NMP/100g e *E. coli* < 2,25 a 5,66 log NMP/100g.

Tabela 2. Resultados das análises microbiológicas (log UFC/g) de ostras *Crassostrea rhizophorae* coletadas em três pontos de cultivo da Reserva Extrativista Marinha Baía do Iguape, Bahia, 2015 (n = 75).

Mês de coleta	PONTO A		PONTO B		PONTO C	
	CT M (DP)	<i>E. coli</i> M (DP)	CT M (DP)	<i>E. coli</i> M (DP)	CT M (DP)	<i>E. coli</i> M (DP)
janeiro	2,78 (1,30)	1,48 (1,09)	1,88 (1,14)	1,03 (0,15)	1,85 (0,54)	1,10 (0,20)
fevereiro	2,97 (1,36)	1,37 (0,98)	3,17 (1,22)	1,47 (1,06)	3,52 (1,05)	1,69 (0,90)
março	3,05 (0,82)	1,74 (0,78)	3,06 (1,15)	2,90 (2,03)	2,75 (1,27)	2,28 (2,22)
abril	1,37 (0,37)	1,55 (1,44)	1,22 (0,30)	1,06 (0,24)	1,74 (0,30)	1,11 (0,27)

Fonte: Dados da pesquisa. \*M: média \*DP: desvio padrão.

Doi et al. (2015), pesquisando a densidade de coliformes no tecido mole das ostras capturadas em Cananéia, São Paulo, observaram que contagem de CT no tecido da ostra variou de 0,43 a 2,40 log NMP/g e dos termotolerantes de 0,24 a 2,40 log NMP/g, sendo os valores médios de 1,88 e 1,53 log NMP/g, respectivamente.

Em estudo sobre a qualidade sanitária de ostras de cultivo no Estado da Bahia, Carvalho et al. (2014), observaram que as ostras dos municípios de Camamu, Maraú, Vera Cruz, Santo Amaro e Taperoá, apresentaram contagem bacteriana de CT variando 2,14 log NMP/g a 5,36 log NMP/g e contagem de *E. coli* variando de 0,95 log NMP/g a 2,95 log NMP/g.

A resolução RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001, que estabelece parâmetros microbiológicos para alimentos, vigente pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), especifica somente o limite máximo permitido de para estafilococos coagulase positiva e de *Salmonella* sp, mas não oferece critérios para as densidades de coliformes em moluscos bivalves *in natura* (Brasil, 2001).

Embora a legislação brasileira não estabeleça valores de referência para a contagem de coliformes totais e termotolerantes em ostras, as pesquisas desses



microrganismos são relevantes, pois, esses se constituem como importantes indicadores da qualidade higiênicossanitária dos alimentos.

A contaminação por CT e *Escherichia coli* indica contaminação de origem fecal e provável presença de patógenos, e podem, ainda, indicar sobre a deterioração do alimento (Franco e Landgraf, 2008).

Os padrões internacionais disponíveis determinam valores limites para coliformes termotolerantes em tecidos moles das ostras cruas. A *Codex Alimentarius* determina o valor de 2,36 log NMP/g como limite para *Escherichia coli* (Codex, 2008).

Na presente pesquisa, os valores médios de contaminação de ostra por ponto de cultivo, permite identificar que apenas o ponto de cultivo B excede ao padrão internacional, com valores de 2,90 log NMP/g. Os valores significativos de coliformes totais e termotolerantes encontrados no presente estudo podem está relacionados com disposição geográfica dos pontos de cultivo, localizados próximos a áreas habitadas pelos pescadores. As regiões ribeirinhas são passíveis de escoamento de efluentes, o que é considerado a principal causa de contaminação ambiental.

Verificou-se a partir da análise de comparação de médias, através do teste Tukey, que não houve diferença estatística da contaminação microbiana entre os pontos de cultivo, entretanto analisando os dados descritivamente observa-se elevada contaminação do ponto B.

Segundo Ramos et al. (2010) a circulação das águas interfere na diluição eficiente dos resíduos e dejetos e, conseqüentemente, na quantidade de coliformes em diferentes pontos da baía, o que não foi observado no presente estudo provavelmente devido a proximidade dos cultivos, salienta-se que para escolha dos pontos de coleta, levaram-se em consideração os pontos de cultivo que eram efetivamente utilizados pelos produtores de ostras.

Os efluentes domésticos, despejados no ambiente podem apresentar constituição bastante variável, como, matéria orgânica, metais tóxicos, microrganismos patógenos, dentre outros contaminantes, podendo causar contaminação de diferentes origens a população (Garrafa, 2009).

Evidencia-se que a microbiota do pescado recém-capturado reflete o ambiente terrestre próximo aos ambientes hídricos e a contaminação da água dos

sistemas pesqueiros pode ocorrer pela entrada direta de fezes advindas de animais das proximidades (Morita et al., 2006).

A densidade de microrganismos nos moluscos bivalves filtradores indica o nível de contaminação do momento da coleta, podendo variar de um animal para outro. Destaca-se a influência dos fatores ambientais, meteorológicos e da atividade geral do organismo do animal (Kolm e Andretta, 2003; Mill et al., 2006).

Observa-se no presente trabalho que o mês de março, apresentou densidade bacteriana em ostras mais elevada que os outros meses de coleta, com valores médios de coliformes totais variando de 2,75 log UFC/g a 3,06 log UFC/g e valores de *E. coli* variando entre 1,74 log UFC/g a 2,90 log UFC/g.

Os valores de contaminação observados nesse mês está relacionada à precipitação de chuva ocorrida na semana anterior à coleta, com valor 204,6 mm, o máximo registrado durante a pesquisa. As análises dos resultados por meio da correlação de Pearson permitiram observar uma correlação positiva entre a os valores de precipitação da chuva e contagem de coliformes totais nas ostras e água de cultivo, com valores altamente significantes ( $p \leq 0,01$ ).

Corroborando com achados encontrados por Doi et al. (2014), Miquelante e Kolm (2011), pesquisando contaminação microbiológica em águas de estuários, relataram correlação positiva na interferência da pluviosidade e densidade de coliformes na água. As chuvas possuem a capacidade de arrastar resíduos, esgotos e dejetos para os cursos d'água que, por sua vez, afluem para o estuário.

Destaca-se no presente trabalho, que a região pesquisada não possui sistema de saneamento básico, além disso, as áreas de cultivo estão localizadas em áreas costeiras, o que corrobora para a contaminação do ambiente local.

Diversos poluentes, principalmente os originados do esgoto doméstico, são lançados no ambiente costeiro sem tratamento adequado e comprometem a qualidade deste recurso hídrico (Dalfior, 2005).

Devido às ostras apresentarem características filtradoras, podendo acumular em seus tecidos moles as partículas presentes na água confere a esses bivalves a condição de bioindicadores de qualidade sanitária do ambiente.

Salienta-se a fisiologia do animal como principal fator para tornar este um alimento perigoso para consumo in natura, podendo acumular em seus tecidos resíduos contaminados do ambiente causando doenças nos consumidores.

Assim, apesar de não contraírem doenças bacterianas, os moluscos filtradores podem agir como portadores de microrganismos patogênicos humanos (Clayton, 2006; Pereira et al. 2006).

A detecção de *E. coli* de patotipos diarreiogênicos reflete as condições sanitárias inadequadas destes ambientes e comprova o risco à saúde pública, pois o fato de abrigarem genes de virulência constitui forte evidência de serem patogênicas para os homens (Kasnowski, 2004).

No presente estudo foi realizada análise da caracterização genotípica dos 30 isolados de *Escherichia coli* de ostra e água de cultivo para verificação dos genes de virulência *stx* e *bfpA*, os quais estão relacionados aos patotipos EHEC e EPEC, respectivamente. O gene *stx* foi identificado em 36,6 % (11/30) das amostras analisadas, sendo dois em amostras de água e nove identificados em amostras de ostras (Figura 1). Destaca-se incidência elevada no ponto de cultivo B, apresentando seis genes *stx* dos 11 totais identificados. O gene *bfpA* não foi identificado em nenhuma das amostras estudadas (Figura 2).

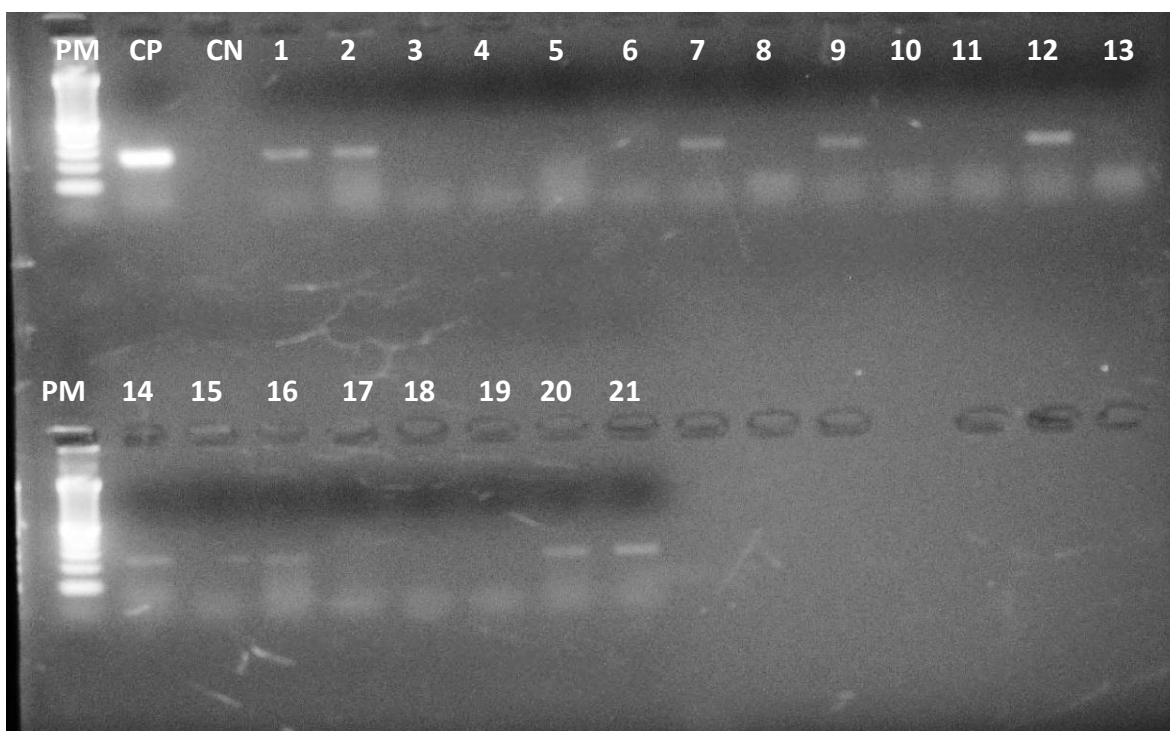


Figura 1: Fotografia do Gel de agarose a 2% da PCR para gene *stx* das amostras de *E. coli* isoladas de ostra e ambiente aquático. Tamanho do fragmento 227pb, PM-Peso Molecular 100pb, CP- controle positivo, CN- controle negativo, amostras positivas (1, 2, 7, 9, 12, 14, 16, 20, 21).



Figura 2. Fotografia do Gel de agarose a 2% da PCR para gene *bfpA* das amostras de *E. coli* isoladas de ostra e ambiente aquático. Tamanho do fragmento 330pb, PM-Peso Molecular 100pb, CP- controle positivo, CN- controle negativo.

A doença diarreica é considerada um dos principais problemas de saúde mundial. Segundo Lanata et al (2013) *E. coli* é um dos agentes etiológicos mais comuns da diarreia nos países em desenvolvimento, responsáveis por metade dos óbitos associados a essa patologia. Dentre os patótipos diarreiogênicos de *E. coli*, destaca-se EHEC podendo causar gastroenterite, colite hemorrágica e Síndrome Hemolítica Urêmica (SHU), uma severa complicação renal e sistêmica devido à ação da toxina Shiga (*Stx*) em diversos órgãos (FRANKEL et al., 1998).

Cardozo (2014) em estudo para detecção de genes de virulência de *Escherichia coli* EHEC e EPEC em peixe de piscicultura e de vida livre no estado de São Paulo observou que 7 % (6/99) das amostras analisadas apresentaram genes *stx*. As estirpe identificadas pelo patótipo EPEC não apresentaram o gene *bfpA*, sendo portanto, considerada pela autora uma EPEC atípica.

Estudo realizado por Almeida et al. (2012), para detecção de genes de virulência de diferentes patótipos de *E. coli* em amostras águas de praia de São Luís-MA coletadas em seis diferentes pontos, evidenciou presença de do gene *stx* em nove por cento das amostras.

Resultados distintos foram encontrados por Célico et al. (2014), investigando genes de virulência *stx* em águas de estuário, no estado de São

Paulo, que verificou que nenhuma das amostras coletadas apresentaram os genes pesquisados.

Cepas patogênicas de *E. coli* podem disseminar-se através dos ecossistemas aquáticos e sua presença nestes ambientes demanda atenção, pois cepas de *E. coli* são dotadas de um grande número de fatores associados à virulência (Vazquez et al., 2012; Pontual et al., 2010).

As infecções relacionadas às cepas patogênicas presença no ambiente aquático podem ocorrer por contato direto com água contaminadas, contudo acredita-se que a ingestão de alimentos de origem marinha crus ou levemente cozidos seja a principal via de exposição do homem aos microrganismos (Mendes et al., 2004).

Segundo Figueiredo (2015), altas concentrações de *Escherichia coli* ingeridas através do consumo dos moluscos bivalves, além de indicar provável contaminação por microrganismos patogênicos humanos, podem causar diversos tipos de infecções intestinais, atingindo desde crianças até adultos, com diversos sintomas como diarreia infantil, diarreia aquosa e intensa, geralmente acompanhada de dores abdominais, vômitos, febre e náuseas (Vieira et al. 2008).

Recomenda-se que a área escolhida para o cultivo seja livre ou controlada de poluição. A produção de ostras cultivadas depende fortemente das condições ambientais da área onde são cultivadas ou extraídas, destaca-se monitoramento contínuo dessas áreas, a partir da contagem de coliformes totais e de colônias de *Escherichia coli* na água e ostra, além das características físico-químicas, através da utilização de técnicas e equipamentos adequados (Figueiredo, 2015).

## **CONCLUSÃO**

De acordo com os resultados, todos os pontos de coleta analisados apresentaram elevadas contagens de coliformes totais, sugerindo cuidado quanto ao consumo de ostras in natura;

Não houve diferença estatística entre os pontos de cultivo, associa-se a este resultado a proximidade entre os pontos;

Os resultados permitiram concluir uma correlação positiva entre os valores de coliformes totais e a precipitação pluviométrica;

Segundo a legislação internacional vigente, as ostras encontram-se próprias para o consumo, por apresentar com valores de população bacteriana dentro dos parâmetros;

Os isolados apresentaram presença de microrganismos patogênicos, evidenciada pela presença do gene de virulência *stx*/EHEC em 36,6 % das amostras.

## **AGRADECIMENTOS**

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pela concessão de bolsa de estudos. Às comunidades de ostreicultores da Reserva Marinha Baía do Iguape por permitirem o estudo com as ostras cultivadas na região. À Dr<sup>a</sup> Elisabeth Duarte pela orientação e disponibilidade do laboratório para análises de biologia molecular.

## **REFERÊNCIAS**

Almeida, N C., Barros, A. L. R., Arouche, S. P., Ferro, T. A. F., Reis, F. H. M., Neto, V. M., Figueiredo, P. M. S. (2012) Detecção de enteropatógenos e teste de susceptibilidade a agentes sanitizantes de cepas diarreio gênicas de *Escherichia coli* isoladas das praias de São Luís – Maranhão. *Revista de Patologia Tropical*. 41 (3), 304-318.

Barros, D. & Barbieri, E. (2012). Análise da ocorrência de metais: Ni, Zn, Cu, Pb e Cd em ostras (*Crassostrea brasiliana*) e sedimentos coletados no Estuário de Cananéia, SP (Brasil). *O Mundo da Saúde*. 36(4), 635-642.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. (2001). Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*.

Canal, N. (2010). Caracterização de resistência a antimicrobianos e diversidade genética em *Escherichia coli* isolada de amostras de água da Lagoa dos Patos. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, PUCRS.

Cardozo, M. V. (2014). Detecção de *Escherichia coli* shigatoxigenica (STEC) e enteropatogenica (EPEC) em peixes de pisciculturas e de vida livre – SP. Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

Célico, A. S., Meneghini, A. K., Saran, L. M.; Alves, L. M. C. (2014). Detecção de genes de virulência de *escherichia coli* em amostras de águas para irrigação. *Ciência & Tecnologia*: 6(1), 145-152.

Clayton, W. E. L. (2006). Microbial Source Tracking-The use of new research tools for the identification and tracking of bacterial pollution sources affecting shellfish culture opportunities. *Marine Ecosystems and Aquaculture Division, Fisheries and Oceans*. 97(87), 134-145.

Codex Alimentarius (CODEX). Standard for live and raw bivalve molluscus. Codex Standard (2008).

Craun, G. F. (1990). Causes of waterborne outbreaks in the United States. In: *American Water Works Association. Water Quality Technology Proceedings*.

Dalfior, J. S. (2005). Avaliação da eficiência do grupo coliforme fecal como indicador de balneabilidade de praias quando comparado com Enterococos: estudo de caso da praia da Curva da Jurema (Vitória, ES).

Doi, S. A.; Barbieri, E., Marques, H. L. de A.D(2014). Densidade colimétrica das áreas de extrativismo de ostras em relação aos fatores ambientais em Cananeia (SP). *Engenharia Sanitária e Ambiental*, 19(2), 156-162.

Doi, S. A.; Fernandes, O. A. J. C.; Barbieri, E. (2015) Determinação de coliformes na água e no tecido mole das ostras extraídas em Cananéia, São Paulo, Brasil. *Revista Engenharia Sanitária Ambiental*. 20(1), 111-118.

Federal Register. (1989). Drinking water; national primary drinking water regulation; total coliforms (including fecal coliforms and *E. coli*); final rule. *Fed. Regist.*, 54(1), 27544–27568.

Figueiredo, J. F., Ribeiro, S. da C. A., Paula, Manoel T. de P., Pontes, A. N. (2015). Determinação da concentração de coliformes totais e termotolerantes na água de cultivo de ostras do mangue (*crassostrea rhizophorae*) em região estuarina. *Enciclopédia Biosfera*. 11(21), 189-198.

Frankel, G., Phillips, A. D., Rosenshine, L., Dougan, G., Kaper, J. B., Knutton, S. (1998). Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *E. coli*: more subversive elements. *Mol. Microbiol.*, 30(56), 911-921.

INPE, Instituto Nacional de pesquisas Espaciais - Programa de Monitoramento em Tempo Real da Região Nordeste - Balanço Hídrico. (2015).

Kasnowski, M. C. (2004) *Listeria* spp., *Escherichia coli*: Isolamento, identificação, estudo sorológico e antimicrobiano em corte de carne bovina (alcatra) inteira e moída. Niterói [Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária – UFF].

Kolm, H. E. & Andretta, L. (2003). Bacterioplankton in different tides of the Perequê tidal creek, Pontal do Sul, Paraná, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 34(1), 97-103.

Lanata, C. F., Fischer-Walker, C. L., Olascoaga, A. C., Torres, C. X., Aryee, M. J., BLACK, R. E. (2013). Child Health Epidemiology Reference Group of the World Health Organization and UNICEF. Global causes of diarrheal disease mortality in children 5 years of age: a systematic review. *PLoS One*, 8(9), 772-788.

Mendes, E. S., Mendes, P. P., Lopes, C. A. M., Coelho, M. I. S., Souza, J. C. R., CRUZ, M. C. S., Assis, A. S. (2004). Sazonalidade dos microrganismos em ostras consumidas na grande Recife, PE. *Revista Higiene Alimentar*. 18(116), 79-87.



Miquelante, F. A. & Kolm, H. E. (2011). Indicadores microbiológicos de poluição fecal na desembocadura da Gamboa Olho d'Água, Paraná: subsídio para o monitoramento da balneabilidade do Brasil. *Biology Health Science*, 17(1), 21-35.

Mill, A., Schlacher, T., Kaouli, M. (2006). Tidal and longitudinal variation of faecal indicator bacteria in an estuarine creek in southeast Queensland, Austrália. *Marine Pollution Bulletin*, 52(8), 881-891.

Morita, M., Matte, G. R., Dropa, M., Marques-Azevedo, V., Matte, M. H. (2006). Utilização de indicadores bacterianos e a pesquisa de *Salmonella* spp na avaliação da qualidade sanitária de águas de pesqueiros. In: Esteves, K. E. Sant'Anna, C. L. Pesqueiros sob uma visão integrada de meio ambiente, saúde pública e manejo. 1 ed. São Carlos: RiMa, 91-104.

Mujika, M., Calvo, M., Lucena, F., Girones, R. (2013). Comparative analysis of pathogens and potencial indicators in shellfish. *International Journal of Food Microbiology*, 83, 75-85.

Muratori, M. C. S., Costa, A. P. R., Viana, C. M., Rodrigues, P. C., Podesta-Junior, R. L. de. (2004). Qualidade sanitária de pescado "in natura". *Higiene Alimentar*. 8(10), 50-54.

National Research Council. Understanding the ocean's role in human health: from monsoons to microbes. Washington D.C: National Academic Press, 1999. 132p

Evangelista-Barreto, N. S.; Pereira, A. F.; Silva, R. A. R.; Ferreira, L. T. B. (2014). Presença de enteropatógenos resistentes a antimicrobianos em ostras e sururus da Baía do Iguape, Maragogipe (Bahia). *Rev. Acad.* 12(1), 25-34.

Pereira, M. A., Nunes, M. M., Nuernberg, L., Schulz, D., Batista, C. R. V. (2006). Microbiological quality of oysters (*Crassostrea gigas*) produced and commercialized in the coastal region of Florianópolis – Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 37,159-163.

Potasman, I., Paz, A., Odeh, M. (2002). Infectious outbreaks associated with bivalve shellfish consumption: a worldwide perspective. *Clinical Infectious Diseases*. 35(8), 921-928.

Ramos, R. J.; Pereira, M. A., Miotto, L. A., Faria, L. F. B., Silveira Junior, N., Vieira, C. R. W. (2010). Microrganismos indicadores de qualidade higiênico-sanitária em ostras (*Crassostrea gigas*) e águas salinas de fazendas marinhas localizadas na Baía Sul da Ilha de Santa Catarina, Brasil. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*. 69(1), 29-37.

Silva, I. M. M., Evêncio-Neto, J., Silva, R. M., Lucena-Silva, N., Magalhães, J., Baliza, M. (2011). Caracterização genotípica dos isolados de *Escherichia coli* provenientes de frangos de corte. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. 63(2), 134-145.

Silva, M. P., Cavalli, D. R., Oliveira, T. C. R. M. (2006). Avaliação do Padrão de Coliformes a 45 °C e comparação da eficiência das técnicas dos tubos múltiplos e Petrifilm EC na detecção de coliformes totais e *Escherichia coli* em alimentos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26(2), 352-359.

Vazquez, M. L., Mosquera, M., Cuevas, L. E., Gonzalez, E. S., VERAS, I. C. L., Luz, E. O.; Batista Filho, M., Gurgel, R. Q. (2012). Incidência e fatores de risco de diarreia e infecções respiratórias agudas em comunidades urbanas de Pernambuco, Brasil. *Caderno de Saúde Pública*, 15(1), 163-171.

Vieira, R. H. S. dos F., Atayde, M., A., Carvalho, E. M. R. de, Fontaneles Filho, A. D. (2008). Contaminação fecal da ostra *Crassostrea rhizophorae* e da água de cultivo do estuário do Rio Pacoti (Eusébio, Estado do Ceará): Isolamento e identificação de *Escherichia coli* e sua susceptibilidade a diferentes antimicrobianos. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci*. 45(3), 180-189.

Zanette, J., Monserrat, J. M., Bianchini, A. (2006) Biochemical biomarkers in gills of mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* from three Brazilian estuaries. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 143(2), 187-195.

## **CAPÍTULO 3**

### **ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia origanoides* FRENTE *Escherichia coli* ISOLADAS DE OSTRAS**

## ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia origanoides* FRENTE *Escherichia coli* ISOLADAS DE OSTRAS

Gabrielly Sobral Neiva<sup>1</sup>, Isabella de Matos Mendes da Silva<sup>2</sup>, Paulo José Lima Juiz<sup>2</sup>, Fernanda Freitas<sup>2</sup>, Lívia Souza Guimarães Rocha e Silva<sup>1</sup> e Simone Teles<sup>1</sup>

1 - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia- Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. Rua Rui Barbosa, 710 - Campus Universitário CEP 44380-000, Cruz das Almas/BA. neiva.gs@hotmail.com.

2 - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia- Centro de Ciências da Saúde, Avenida Carlos Amaral, 1015 - Cajueiro, Santo Antônio de Jesus/BA, CEP 44.570-000.

### Resumo

As Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) por vezes são associadas ao consumo de moluscos bivalves, tais como as ostras, que podem bioacumular resíduos do ambiente, propiciando a contaminação por microrganismos patogênicos, como a *Escherichia coli*. Portanto, a qualidade sanitária dos produtos alimentícios é alvo de crítica dos consumidores, os quais exigem cada vez mais uma cadeia produtiva adequada e livre de aditivos químicos. Uma das estratégias de controle da população microbiana é o uso de produtos naturais como os óleos essenciais (OE) que tem ganhado destaque pelo seu potencial antimicrobiano. Desta forma, o objetivo do presente estudo foi verificar a ação antimicrobiana do OE de *Lippia origanoides* frente a cepas de *Escherichia coli* isoladas de amostras de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) e cepas padrão ATCC dos patótipos EHEC (ATCC 43895), EPEC (CDC O111ab), ETEC (ATCC 11229). O óleo essencial de *Lippia origanoides* foi obtido através de hidrodestilação. A análise da composição química foi feita por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, sendo os compostos majoritários descritos: carvacrol (48 %), p-cimeno (6,27 %) e timol (4,10 %). Para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi utilizada a técnica microdiluição em caldo proposto pelo CLSI (2003) com adaptações. Posteriormente as concentrações inibitórias foram avaliadas quanto ao seu potencial bacteriostático ou bactericida. Os resultados

apontaram que o óleo essencial de *Lippia origanoides* mostrou ação inibitória frente a todas as cepas estudadas. A CIM para as cepas isoladas de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) e cepas padrão foi de 1,09 mg.mL<sup>-1</sup>, sendo esta concentração considerada bacteriostática e bactericida, respectivamente. A concentração bactericida mínima para ETEC (ATCC 11229) foi 1,09 mg.mL<sup>-1</sup> e para EHEC (ATCC 43895), e EPEC (CD O111ab) foram de 0,54 mg.mL<sup>-1</sup>. Infere-se que o óleo essencial estudado apresenta potencial biotecnológico para o desenvolvimento de antimicrobianos no controle de bactérias patogênicas, entretanto, a sua utilização em alimentos deverá ser pautada em análises sensoriais.

**Palavras-chaves:** Contaminação bacteriana, moluscos bivalves, antimicrobiano natural.

### **Abstract**

The Foodborne Diseases (FBD) are sometimes associated with the consumption of bivalve molluscs, such as oysters, which can bioaccumulate environmental waste, leading to contamination by pathogenic microorganisms such as *Escherichia coli*. One of the microbial population control strategies is the use of natural products such as essential oils (EO) that has gained prominence for its antimicrobial potential. Thus, the aim of this study was to verify the OE antimicrobial action *Lippia origanoides* against strains of *Escherichia coli* oyster samples (*Crassostrea rhizophorae*) and strains standard ATCC of EHEC pathotypes (ATCC 43895), EPEC (CDC O111ab), ETEC (ATCC 11229). The essential oil of *Lippia origanoides* was obtained by hydrodistillation. The chemical composition analysis was performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry, the major compounds being described: carvacrol (48%), p-cymene (6.27%) and thymol (4.10%). To determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) technique was used microdilution proposed by the CLSI (2003) with adaptations. Subsequently inhibitory concentrations were evaluated for their potential bacteriostatic or bactericidal. The results showed that the essential oil of *Lippia origanoides* showed inhibitory action across all strains studied. The MIC for the isolated strains of oysters (*Crassostrea rhizophorae*) and standard strains was 1.09 mg.mL<sup>-1</sup>, and this concentration considered bacteriostatic and bactericidal,

respectively. The minimum bactericidal concentration for EPEC (ATCC 11229) was found 1.09 mg.mL<sup>-1</sup> and EHEC (ATCC 43895) and EPEC (CD O111ab) were 0.54 mg.mL<sup>-1</sup>. It infers that the essential oil has studied biotechnological potential for the development of antimicrobials in the control of pathogenic bacteria, however, its use in food should be based on sensory analysis.

**Keywords:** Bacterial contamination, bivalve molluscs, natural antimicrobial.

## INTRODUÇÃO

Óleos essenciais (OEs) são definidos como substâncias complexas oriundas do metabolismo secundário de vegetais, apresentam-se na forma líquida, com aroma agradável e intenso, possuem propriedades voláteis e lipofílicas, podem ser extraídos de caules, flores, frutos e raízes de diversas espécies de vegetais aromáticos e possuem diferentes aplicações (Simões & Spitzer, 2004).

A utilização dos OEs tem sido relatada em vários segmentos, mostrando propriedades, como, antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas, bem como o uso nos setores de higiene pessoal e controle higiênico-sanitário dos alimentos (Costa, 2008).

As propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais têm despertado interesse pela perspectiva de constituírem uma alternativa quanto à utilização de aditivos químicos em alimentos. Podendo os OEs inibir bactérias de origem alimentar e prolongar a vida de prateleira de alimentos processados (Millezi et al., 2014).

Alguns estudos destacam a atividade antimicrobiana dos OEs frente a diversos microrganismos. Os estudos ressaltam que estes compostos apresentam diferenças na composição química, quando se compara os óleos extraídos de plantas de diferentes espécies ou da mesma (Castro et al., 2011; Galvis et al., 2011; La Rosa et al., 2011; Andrade et al., 2014; Sarrazin et al., 2015).

Essas variações tendem a influenciar a atividade antimicrobiana dos óleos e são determinadas geralmente em função de fatores genéticos e fatores abióticos. Além disso, os constituintes dos OEs encontram-se em concentrações distintas e sua atividade ocorre por ação sinérgica dos compostos (Millezi et al., 2013; Nogueira et al., 2007; Gobbo-Neto & Lopes, 2007; Morais, 2009).

Dentre as bactérias contaminantes de alimentos e relatadas como agentes causadores de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), destaca-se a *Escherichia coli*. A bactéria *E. coli* é agente causador de gastroenterites, a contaminação de se dá principalmente por contato com material fecal ou com superfícies contaminadas, e por manipulação inadequada dos alimentos, sendo responsável por inúmeros casos de DTAs (Nascimento & Stamford, 2000).

Embora por um lado exista disponível uma grande variedade de antibióticos, por outro lado deve-se destacar o aumento crescente do surgimento de microrganismos resistentes aos antimicrobianos o que tem incentivado a busca por alternativas terapêuticas com atividade antimicrobiana. Neste contexto, a Organização Mundial de Saúde, considera as plantas medicinais como melhores fontes para obtenção de moléculas bioativas (Prashar et al., 2003).

Dentre os óleos essenciais estudados, o OE de *Lippia origanoides* (Kunth) destaca-se por apresentar atividade antimicrobiana com amplo espectro de ação, frente a bactérias Gram -positivas e Gram-negativas, fungos e leveduras.

O gênero *Lippia* (Verbenaceae) reúne espécies, que são na sua maioria aromáticas, e são encontradas em países das Américas Central e do Sul. No Brasil, encontra-se nos estados da Bahia, Minas Gerais e Goiás. Várias espécies de *Lippia* são de importância etnofarmacológica, sendo utilizadas principalmente no tratamento de doenças gastrointestinais, infecções cutâneas e respiratórias (Pascual et al., 2001; Oliveira et al., 2007).

A espécie *Lippia origanoides*, popularmente conhecida como, alecrim de tabuleiro, é um subarbusto pouco ramificado, com folhas aromáticas. É uma planta rica em óleo essencial cuja composição química é constituída principalmente por derivados fenólicos como carvacrol e timol (Albuquerque, 2006).

Seu uso está relacionado à medicina veterinária, microbiologia, parasitologia, zootecnia e aquicultura, devido ao seu potencial e facilidade de produção agrônômica em escala (Soares & Tavares-Dias, 2013).

Desse modo, o objetivo desse estudo foi verificar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Lippia origanoides* extraído de folhas e inflorescências, frente à *Escherichia coli* isoladas de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) cultivadas na Baía dos Iguape, Bahia, e cepas de *E. coli* padrão de

três patotipos: enteroemorrágica (ATCC 43895), enteropatogenica (CDC O111ab) e enterotoxigenica (ATCC 11229).

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Óleo essencial**

O óleo essencial extraído de folhas e inflorescências de *Lippia origanoides* foi gentilmente cedido pelo Laboratório de Fitoquímica da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, o qual foi originário do cultivo da planta realizado entre janeiro a março do ano 2014, conduzido na Unidade Experimental do Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana-UEFS, Bahia. Esta unidade situa-se a 234 metros de altitude, na latitude de 12°16'00" Sul e longitude de 38°58'00" Oeste. Durante o período de cultivo foi registrado pluviosidade média de 750 mm por ano e temperatura variando em torno de 26 °C. Segundo a classificação de Köppen, o clima do local de cultivo é do tipo BSh, semiárido quente.

Para obtenção do óleo foi usada a técnica de hidrodestilação por arraste a vapor a partir de folhas e inflorescências secas de *Lippia origanoides*. As amostras foram secas a temperatura de 100 °C, até que não houvesse variação na pesagem de 0,1 % em 30 s. O processo de extração do óleo essencial foi conduzido durante 3 horas. A composição química do óleo essencial foi determinada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM), em cromatógrafo Shimadzu CG-2010 acoplado a Espectrômetro de Massas CG/MS-QP 2010 Shimadzu, coluna WCOT de sílica fundida, 30 m x 0,25 µm, injetor CP-1177, temperatura do injetor 220 °C, gás de arraste Hélio (1 mL/min), temperatura da interface de 240 °C, temperatura da fonte de ionização de 240 °C, energia de ionização 70 eV, corrente de ionização 0,7 kV e programa de temperatura do forno 60 °C a 240 °C (3 °C/min), 240 °C (20 min). Os componentes foram identificados através da comparação dos espectros de massas obtidos com os da biblioteca do equipamento e por comparação dos



Índices de Kovats (IK) calculados com a literatura (Adams, 1995) empregando uma série homóloga de hidrocarbonetos.

## **Microrganismos**

No presente estudo foram utilizadas cepas de *Escherichia coli* isoladas de ostras *Crassostrea rhizophorae* cultivadas em três diferentes pontos (A, B e C) na Reserva Extrativista Baía do Iguape, Bahia. Também foram testadas cepas padrão da *American Type Culture Collection* (ATCC) dos patótipos enteroemorrágica - EHEC (ATCC 43895), enteropatogênicas - EPEC (CDC O111ab) e enterotoxigênica - ETEC (ATCC 11229) obtidas do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/FIOCRUZ - BRASIL).

Para preparo da suspensão bacteriana de trabalho, os microrganismos teste foram previamente cultivados em placa de Petri contendo Ágar nutriente por um período de 18 h a 35 °C. Três a cinco colônias desta cultura recente foram suspendidas em solução salina a 0,45 % até se obter uma suspensão bacteriana na concentração de  $1,5 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>. O ajuste da concentração foi feito em espectrofotômetro, com comprimento de onda de 625 nm e densidade óptica entre 0,08 a 0,1 o que corresponde à concentração 0,5 da escala de Mac Farland. Esta suspensão inicial foi diluída em solução salina obtendo-se uma concentração final de  $1,5 \times 10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>.

## **Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)**

Para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi utilizado o ensaio de suscetibilidade por microdiluição em caldo recomendado pelo CLSI (2003), com adaptações, sendo que todos os testes foram realizados em triplicatas.

Inicialmente o óleo essencial de *Lippia origanoides* foi diluído em Tween 80 a 10 % de modo a obter uma solução estoque de 70 mg.mL<sup>-1</sup>, a qual foi posteriormente esterilizada utilizando filtros de porosidade de 0,22 µm.

Foram preparadas diluições seriadas na ordem de 35 mg.mL<sup>-1</sup> a 0,27 mg.mL<sup>-1</sup> dos compostos testados em placas de microtitulação de 96 poços. Em seguida, cada poço recebeu 10 µL da suspensão de microrganismo teste na concentração de 1,5 x 10<sup>6</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>. As placas foram incubadas à 37 °C por 24 horas e a determinação da CIM foi feita pelo método colorimétrico utilizando 30 µL de resazurina 0,01 %. Como controle foi usado: gentamicina 10 mg.mL<sup>-1</sup>, controle de viabilidade do microrganismos teste, controle de esterilidade do meio e controle da influência do solvente (Tween 80) sobre o crescimento microbiano. Cinco microlitros do conteúdo dos poços que mostraram atividade foram inoculados em ágar Müeller Hinton para determinação da concentração bactericida mínima (CBM). O crescimento bacteriano no meio de cultura contido na placa de Petri caracterizou o composto como tendo atividade bacteriostática, a ausência de crescimento, atividade bactericida.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os principais constituintes químicos identificados por CG/MS no óleo essencial extraído de *L. origanoides* foram: carvacrol (58,60 %), p-cinemo (6,27 %), E-cariofileno (4,13 %) e timol (4,10 %), sendo o carvacrol considerado o composto majoritário (Tabela I).

Segundo Sarrazin et al. (2015) a composição química do óleo de *Lippia origanoides* coletada em diferentes estações do ano, mostrou como compostos principais o carvacrol (42,6 %), timol (10,6 %) e p-cinemo (9,9 %) independente do período de colheita. Já Andrade et al. (2014) analisando atividade antimicrobiana e toxicidade do OE de *Lippia origanoides*, evidenciou como compostos majoritários o carvacrol (29 %), seguido por p-cinemo (25,6 %) e éter metil timol (11,5 %). Estes resultados foram parecidos com os apresentados por este trabalho, diferindo apenas nas concentrações identificadas, mostrando a influência da sazonalidade na composição química dos óleos essenciais.

Galvis et al. (2011) avaliaram a composição química de nove óleos essenciais obtidos da extração de folhas de *L. origanoides*, coletadas a partir de quatro diferentes regiões da Colômbia, a análise dos óleos revelaram a presença de três quimiotipos: timol (9,2 a 59,7 %), carvacrol (1,7 a 46,2 %) e p-cinemo (8,8 a 13,9 %) com diferentes concentrações.

TABELA I. Componentes químicos identificados no óleo essencial de *Lippia organoides* e seus respectivos índices de Kovats calculados (IKCalc), índices de Kovats da literatura (IKLit)

Contituíntes	IKCalc	IK Lit	%
(2E)-Hexenal + (3Z)-Hexenol			tr.a
Pent-4-enoato de etila	884	888	tr.a
$\alpha$ -Tujeno	930	930	0,53 $\pm$ 0,15
$\alpha$ -Pino	938	939	tr.a
Canfeno	954	954	0,33 $\pm$ 0,06
1-Octen-3-ol	980	979	tr.a
Mirceno	992	990	0,93 $\pm$ 0,15
$\alpha$ -Terpineno	1019	1020	0,70 $\pm$ 0,17
$\rho$ -Cimeno	1028	1024	6,27 $\pm$ 0,40
Limoneno	1032	1029	0,20 $\pm$ 0,12
$\gamma$ -Terpineno	1063	1064	3,97 $\pm$ 0,81
Linalool	1100	1196	2,53 $\pm$ 0,61
Cânfora	1148	1146	1,10 $\pm$ 0,00
Borneol	1169	1169	0,60 $\pm$ 0,10
Terpinen-4-ol	1180	1177	0,53 $\pm$ 0,06
Metil timil eter	1238	1235	2,53 $\pm$ 0,12
Timol	1296	1290	4,10 $\pm$ 0,10
Carvacrol	1311	1299	58,60 $\pm$ 2,23
Acetato de carvacrol	1376	1372	0,50 $\pm$ 0,10
E-Cariofileno	1423	1419	4,13 $\pm$ 0,50
$\alpha$ -Bergamoteno	1438	1434	tr.a
Aromadendreno	1442	1441	0,67 $\pm$ 0,06
$\alpha$ -Humuleno	1457	1454	1,43 $\pm$ 0,15
Biciclogermacreno	1500	1500	3,23 $\pm$ 0,50
7-epi- $\alpha$ -Selineno	1521	1522	0,37 $\pm$ 0,06
Espatulenol	1581	1578	2,20 $\pm$ 0,35
Óxido de cariofileno	1586	1583	1,60 $\pm$ 0,26
Viridiflorol	1594	1592	0,33 $\pm$ 0,06
Total identificado			97,40

tr.a= não identificado

Estudo realizado por Cavalcante et al. (2009) no estado do Piauí obtiveram em maior concentração o carvacrol, correspondendo a 43,96 % do óleo, o 1,8-cineol com 22,75 %, o  $\gamma$ -terpineno com 8,87 %, metil timol com 7,08 % e acetato de carvacrol com 4,60 %.

Divergindo dos achados encontrados no presente estudo e nos citados acima, Fontenelle et al. (2007), relatou composição química composta por aproximadamente 60 % de timol de óleo essencial de nativo espécimes de *L. organoides* do Nordeste do Brasil.

Essas diferentes composições químicas influenciam diretamente nas atividades biológicas destes óleos essenciais, o que mostra a importância do manejo agroecológico de plantas medicinais com finalidade industrial.

Pode-se perceber que a origem do material botânico coletado nos estudos apresentados são provenientes de regiões geográficas distintas, o que pode

explicar a diferença da composição química. Segundo Morais (2009) fatores abióticos, como, sazonalidade, condições de plantio, disponibilidade de água, luminosidade, temperatura, tipo de solo, estágio de desenvolvimento da planta e seu estado nutricional e condições de colheita influenciam significativamente na produção dos metabólitos secundários das plantas, o que explica os resultados apresentados.

Segundo Gobbo-Neto & Lopes (2007), a época em que a planta é coletada é um dos fatores de maior importância, visto que a quantidade e a composição dos constituintes ativos não são constantes durante o ano, podendo influenciar além da quantidade total de metabólitos produzidos, também nas proporções relativas dos componentes.

Além disso, Bezerra et al. (2011) relataram que o horário de corte das folhas de *L. alba* influenciou no rendimento de óleo essencial, obtendo-se uma maior produção em amostra coletadas ao meio-dia.

A literatura destaca a presença do composto p-cimeno na composição do OE de espécies de *Lippia* e relata que este composto atua como precursor tanto do timol quanto do carvacrol. Estudos mostraram que o p-cimeno está sempre presente em quantidades razoáveis (5 – 34 %) semelhante ao observado no presente trabalho (Oliveira et al. 2007; Galvis et al. 2011; Stashenko et al. 2010; Veras et al. 2012 e Farias-Junior et al. 2012).

A presença do carvacrol, p-cimeno e timol conferem a espécie de *Lippia* estudada, o uso medicinal e com potencial antimicrobiano, entretanto, não podemos afirmar que a atividade antimicrobiana é atribuída apenas aos compostos majoritários citados, visto que a atividade biológica pode ser o resultado do efeito sinérgico existente entre compostos majoritários e aqueles em menor concentração (Hyldgaard, 2012).

No presente trabalho, o ensaio para determinação da CIM demonstrou que o óleo essencial de *Lippia origanoides* possui atividade antimicrobiana frente a todas as cepas estudadas, como demonstrado na tabela II.

A literatura não estabelece valores padrões sobre o nível de inibição aceitável para produtos naturais. A classificação proposta por Wange (2014) leva em consideração os resultados da CIM, categorizando como, atividade forte: CIM < 0,01 mg/mL<sup>-1</sup>; atividade forte a moderada: CIM 0,01-1 mg/mL<sup>-1</sup>; atividade fraca a moderada: CIM 0,1-1 mg/mL<sup>-1</sup> e atividade fraca: CIM > 1 mg/mL<sup>-1</sup>.

Deste modo, o óleo essencial de *Lippia origanoides* estudado pode ser considerado um inibidor fraco de *Escherichia coli*, uma vez que houve a inibição de todas as cepas com valor de CIM de 1,09 mg/mL.

TABELA II. Concentração Inibitória Mínima (MIC) e Concentração Bactericida Mínima (CMB) de óleo essencial de *Lippia origanoides* frente à *Escherichia coli* isoladas de ostra (*Crassostrea rhizophorae*) e cepas de *E. coli* padrão.

Bactérias	CIM (mg/mL <sup>-1</sup> )	CBM (mg/mL <sup>-1</sup> )
Cepas isoladas A	1,09	4,37
Cepas isoladas B	1,09	4,37
Cepas isoladas C	1,09	1,09
ETEC (ATCC 11229)	1,09	1,09
EHEC (ATCC 43895)	1,09	2,18
EPEC (CD O111ab)	1,09	2,18

Acredita-se que o mecanismo de ação de compostos naturais baseia-se principalmente em efeitos tóxicos na membrana celular, comprometendo a função à permeabilidade seletiva (Sikkema et al. 1995).

Em geral para a espécie estudada, são os compostos majoritários timol e carvacrol que possuem forte atividade antimicrobiana contra fungos e bactérias (Gomes et al. 2011).

A atividade antimicrobiana descrita no presente trabalho poderia ser atribuída ao carvacrol, visto que as características hidrofóbicas e fenólicas do carvacrol, composto majoritário do óleo de *Lippia origanoides* estudado, permite que este composto consiga interagir com a camada fosfolipídica da membrana plasmática e também com proteínas da membrana bacteriana, causando o extravazamento do material celular (Burt, 2004).

Embora este seja o primeiro relato de atividade antimicrobiana do óleo de *L. origanoides* frente a bactérias isoladas de ostra *Crassostrea rhizophorae*, a literatura traz resultados para ação inibitória do OE frente a cepas isoladas de diferentes amostra de alimentos e de origem de coleções de culturas.

La Rosa et al. (2011) analisaram atividade antimicrobiana de óleo essencial de *L. origanoides* em bactérias isoladas (*Escherichia sp.*) de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). Os óleos testados também apresentaram atividade fraca

frente aos microrganismos isolados, com CIM de 12,50 mg/mL, sendo o constituinte majoritário o carvacrol (43 %).

Segundo Souza et al. (2015), óleo de *Lippia origanoides* mostrou efeito inibitório frente a *E. coli* isoladas de aves a partir da concentração de 40 µL/mL. Entretanto, a atividade bactericida do estudo foi obtida na concentração de 160 µL/mL.

Costa et al. (2011) observaram efeito bactericida do óleo essencial de *Lippia sidoides* frente a cepas de *E. coli* isoladas de leite na concentração de 320 µL/mL.

Castro et al. (2011), mostraram que óleo essencial de *Lippia origanoides* apresentou atividade antimicrobiana frente a *E. coli* isoladas de queijos artesanais, com CIM de 13 µL/mL para todas as bactérias testadas e CBM de 25 µL/mL.

Betancourt et al. (2012) testaram o óleo essencial de *L. origanoides* em diversas amostras de *Escherichia coli* ATCC, com valores de CIM entre 0,098 mg/mL a 0,50 mg/mL, sendo o quimiotipo avaliado rico em timol.

Observa-se no presente estudo diferença entre os perfis de susceptibilidade antimicrobiana das bactérias analisadas. Os microrganismos isolados de ostra *Crassostrea rhizophorae* apresentaram maiores CBMs quando comparados às cepas ATCC o que sugere maior resistência à ação do óleo de *Lippia origanoides* pesquisado, para os isolados.

Salienta-se que as ostras analisadas no presente trabalho são produzidas em áreas de cultivos localizadas em áreas costeiras, desprovida de sistema de saneamento, acometida por poluição humana, o que corrobora para a contaminação do ambiente local.

As características pertinentes ao ambiente poderiam exercer pressões seletivas através de efluentes domésticos e industriais capazes de selecionar microrganismos multirresistentes. Estudos demonstram que a seleção de determinantes de resistência aos antimicrobianos no ambiente poderia acontecer por meio da poluição ambiental, presença de metais tóxicos e químicos (Alonso et al. 2001).

O aparecimento de cepas de *E. coli*, de origens variadas e multirresistentes constitui uma preocupação para a saúde pública, pois dificulta ou inviabiliza o tratamento de doenças causadas por estas cepas resistentes (Mendonça et al.

2007; Costa et al. 2008), razão pela qual tem sido registrado na literatura um crescente aumento nas pesquisas com produtos naturais com potencial antimicrobiano.

A este respeito, estudos *in vitro* onde se comparam a atividade antimicrobiana de óleos essenciais extraídos de plantas do gênero *Lippia* e fármacos-controles, foi observado que a ação antimicrobiana de óleos essenciais apresentou-se superior à ação dos fármacos (Oliveira et al. 2006; Oliveira et al. 2007; Nogueira et al. 2007; Sarrazin et al. 2012; Zare et al. 2012; Fontenelle et al. 2007).

O uso de óleos essenciais como agentes antimicrobianos torna-se uma alternativa aos antimicrobianos usuais por apresentarem complexa composição, agindo de maneiras distintas frente aos microrganismos, o que torna mais difícil a adaptação microbiana (Queiroz, 2014).

Deste modo, os compostos de natureza vegetal, apresentam um potencial relevante como agentes de inibição do crescimento bacteriano, constituindo-se como uma alternativa promissora no controle de patógenos em alimentos.

Ainda que o óleo essencial estudado tenha sido caracterizado como de fraca atividade, segundo a classificação de Wange (2014), cabe salientar que ainda não existe na literatura uma classificação totalmente aceitável para caracterizar a atividade biológica de um óleo essencial, ademais, a composição química do óleo de *L. origanoides* estudado, mostrou a presença de compostos químicos com grande potencial biotecnológico na formulação de medicamentos.

É preciso ressaltar que, segundo a literatura, o óleo essencial de *Lippia origanoides* apresenta baixa toxicidade. Em estudo realizado por Andrade et al. (2014) realizado em ratos tratados com este óleo, foram observados efeitos tóxicos inexistentes, sem alterações histopatológicas no fígado, rins e coração dos animais após meses de tratamento. Esta baixa toxicidade estimula novos estudos deste composto natural, que poderá ter inúmeras aplicabilidades industriais, uma delas na área de alimentos.

No entanto, a composição da matriz alimentícia poderá interferir na ação do óleo essencial, o que pode limitar sua utilização em alimentos, podendo ainda modificar organolépticamente o produto final (Burt, 2004; Del Campo et al. 2000).

Torna-se necessário ensaio futuros para avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Lippia origanoides* em alimento em condições de consumo,

além de análises sensoriais, tendo em vista que o uso de altas concentrações de óleo essencial poderá comprometer a aceitação do produto.

## CONCLUSÃO

O óleo essencial de *Lippia origanoides* apresentou ação antimicrobiana frente todas as cepas testadas, sendo que os valores de CBM registrada para cepas padrão foram menores quando comparadas as cepas isoladas de ostras;

Os resultados promissores dos testes demonstra o potencial deste óleo como alternativa aos antimicrobianos e uso no controle sanitário de produtos alimentícios.

Infere-se que o mesmo pode ser usado no controle de bactérias patogênicas, porém, a sua utilização em alimentos deverá ser pautada em análises sensoriais.

## AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pela concessão de bolsa de estudos. À Dr<sup>a</sup> Simone Teles por disponibilizar amostras do óleo de *Lippia origanoides* para realização dos testes de susceptibilidade antimicrobiana. À Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) do Rio de Janeiro pela disponibilização das cepas padrão utilizadas como controle positivo. Às comunidades de ostreicultores da Reserva Marinha Baía do Iguape por permitirem o estudo nas suas unidades de cultivo e cessão das ostras para pesquisa.

## REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, CC. et al. Antimicrobial Action of the Essential Oil of *Lippia gracilis* Schauer. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 4, p. 527-535, 2006.

ALONSO, A; SÁNCHEZ, P; MARTÍNEZ, JL. Environmental selection of antibiotic resistance genes. **Environmental Microbiology**, v.3, n.1, p. 1-9, 2001.



ANDRADE, VA; ALMEIDA, AC; SOUZA, DS; COLEN, KGF; MACÊDO, AA; MARTINS, ER; FONSECA, FSA; SANTOS, RL. Antimicrobial activity and acute and chronic toxicity of the essential oil of *Lippia origanoides*. **Pesquisa de Veterinária Brasileira**, v. 34, n.12, p. 1153-1161, 2014.

BETANCOURT, L; PHANDANAUVONG, V; PATIÑO, R; ARIZANIETO, C; AFANADORTELLEZ, G. Composition and Bactericidal activity against beneficial and pathogenic bacteria of oregano essential oils from four chemotypes of *Origanum* and *Lippia* genus. Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, v. 59, n.1, p. 21-31, 2012.

BEZERRA, F. N. R.; ROLIM, R. R.; SANTOS, H. R.; MARCO, C. A.; FEITOSA, J. V.; COSTA, A. N. L. Rendimento do óleo essencial de cidreira brava (*Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. em diferentes horários de corte. **Cadernos de Agroecologia**, v. 6, n. 2, p. 1-5, 2011.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

CASTRO, C.E. et al. Antimicrobial activity of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, n.3, p. 293-297, 2011.

CAVALCANTE, I.M.S.M. et al. Potencial Mutagênico (Teste de micronúcleos) e composição química dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* e *Lippia origanoides*. In: 32ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 108, Fortaleza-CE, **Anais**. Fortaleza: Adaltech Soluções para eventos, 2009.

COSTA, D. et al. Mechanisms of Antibiotic Resistance in *Escherichia coli* Isolates Recovered from Wild Animals. **Microbial Drug Resistance**, v. 14, n. 1, p. 71-77, 2008.

DEL CAMPO, J.; AMIOT, M.J.; NGUYEN-THE, C. Antimicrobial effect of rosemary extracts. **Journal of Food Protection**, v.63, n. 10, p. 1359-1368, 2000.

FARIAS-JUNIOR, P.A. et al. Leishmanicidal activity of carvacrol-rich essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Biology Research**, v. 45, p. 399-402, 2012.

FONTENELLE, R.O.S. et al. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, n. 5, p. 934-940, 2007.

GALVIS, L.B. et al. Antifungal, cytotoxic and chemical analyses of essential oils of *Lippia origanoides* H.B.K grown in Colombia. **Revista de la Universidad Industrial de Santander**, v. 43, n. 2, p. 141-148, 2011.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GOMES, S.V.F.; NOGUEIRA, P.C.L.; MORAES, V.R.S. Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer. **Ecletica Química**, v.36, n.1, p. 64-77, 2011.

HYLADGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R.L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. 12, p. 1-24, 2012.

LA ROSA, M. G. N. **Evaluación preliminar de las poblaciones bacterianas asociadas al tracto intestinal de la tilapia (*Oreochromis niloticus*) expuesta a aceites esenciales de orégano en la dieta**. 2011. 98p. Tese (Doutorado) Universidade Nacional da Colômbia, Bogotá.

MENDONÇA, N. et al. Spread of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase CTX-Mproducing *Escherichia coli* clinical isolates in community and nosocomial

environments in Portugal. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 6, p. 1946–1955, 2007.

MILLEZI, A.F. et al. Caracterização e atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.16, n.1, p. 18-24, 2014.

MORAIS, L.A.S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 2, p. 4050-4063, 2009.

NASCIMENTO, M.R.; STAMFORD, T.L.M. Incidência de *Escherichia coli* O157:H7. **Revista de Higiene Alimentar**. v. 14, n. 70, p.32-35, 2000.

NOGUEIRA, M.A.; DIAZ, G.; SAKUMO, L. Caracterização química e atividade biológica do óleo essencial de *Lippia alba* cultivada no Paraná. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 3, p. 273 - 278, 2007.

OLIVEIRA, D.R. et al. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia organoides* H.B.K. **Food Chemistry**. v.101, p. 236-240, 2007.

OLIVEIRA, D.R. et al. Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximiná, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, p. 103-108, 2006.

PASCUAL, M.E.K. et al. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal Ethnopharmacol**. v. 76, n. 3, p. 201-214, 2001.

PINTO, C.D.P.; RODRIGUES, V.D.; PINTO, F.D.P. Antimicrobial activity of *Lippia* species from the Brazilian semiarid region traditionally used as antiseptic and anti-infective agents. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1-5, 2013.

PRASHAR, A. et al. Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae*. **Phytochemistry**. v. 63, p. 569-575, 2003.

QUEIROZ, M.R.A. et al. Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de *Lippia organoides* frente à *Staphylococcus* sp. isolados de alimentos de origem animal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.16, n. 3, p. 737-743, 2014.

SARRAZIN, S.L. et al. Antimicrobial and seasonal evaluation of the carvacrol-chemotype oil from *Lippia organoides* Kunth. **Molecules**, v. 2, p. 1860-1871, 2015.

SARRAZIN, S.L.F. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Lippia grandis* Schauer (Verbenaceae) from the western Amazon. **Food Chemistry**, v. 134, n. p. 1470-1478, 2012.

SIKKEMA, J.; BONT, J.A.M.; POOLMAN, B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 18, p. 8022-8028, 1994.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre: UFRGS, 2004, p. 467-95.

SOARES, B.V.; TAVARES-DIAS, M. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. **Revista Biota Amazônia**. v. 3, n. 1, p. 109-123, 2013.

SOUZA, D.S. et al. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Lippia organoides* e *Lippia rotundifolia* frente a enterobactérias isoladas de aves. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 67, n. 3, p. 940-944, 2015.

STASHENKO, E.E. et al. *Lippia organoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. **Journal of Separation Science**, v. 33, n. 1, p. 93-103, 2010.

VERAS H.N. et al. Synergistic antibiotic activity of volatile compounds from the essential oil of *Lippia sidoides* and thymol. **Fitoterapia**, v. 83, p. 508-12, 2012.

WANG, X. et al. Fumigant, contact, and repellent activities of essential oils against the darkling beetle, *Alphitobius diaperinus*. **Journal of Insect Science**, v. 14, n. 75, p. 1-11, 2014.

ZARE, Z. et al. Antimicrobial activity of leaf and flower extracts of *Lippia nodiflora* L. (Verbenacea). **Journal of Plant Protection Research**, v. 52, n. 4, p. 401-403, 2012.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O potencial produtivo de ostras no Estado da Bahia, alavancado pela produção na Baía do Iguape, aponta para relevância do desenvolvimento de estudos na região abrangendo os aspectos sanitários, ambientais, econômicos e sociais.

Assim, destaca-se a importância de cultivar os moluscos em um ambiente com água de boa qualidade, garantindo a qualidade sanitária do produto final. Neste contexto, a presente pesquisa destaca a necessidade de revisão da legislação brasileira vigente, de forma a incluir microrganismos indicadores de contaminação em moluscos bivalves crus, como *Escherichia coli*, como ferramenta de controle da inocuidade desses pescados, pois esses constituem-se como eficientes indicadores de contaminação fecal e de poluição do ambiente, conseqüentemente, da sanidade animal, além de apresentarem como importantes microrganismos patogênicos humano.

Apesar dos resultados do presente estudo evidenciar que os animais cultivados na Reserva Marinha Baía do Iguape apresentam qualidade sanitária satisfatória segundo os limites de contaminação estabelecidos pela legislação internacional, os genes de virulência detectados nas mesmas amostras (EHEC) sugerem cuidado para o consumo, devido ao potencial patogênico dessas cepas. Ressalta-se a relevância de inclusão da determinação limites para os patótipos de *E. coli* de maior patogenicidade nas normas sanitárias nacional e internacional, como forma de minimizar riscos aos consumidores.

Além da detecção de microrganismos patógenos, observa-se que estratégias de controle no processo produtivo devem ser desenvolvidas para melhoria da qualidade microbiológica das ostras como o uso de antimicrobianos naturais.

Foi evidenciado no presente estudo o potencial antimicrobiano de óleo essencial extraído de *Lippia origanoides* (Kunth), porém, apesar dos resultados promissores faz-se necessário a continuidade de estudos que avaliem a atividade antimicrobiana do óleo associado diretamente a matriz alimentícia pesquisada, e a viabilidade do uso desse óleo no beneficiamento das ostras.

# Anexos

## **Normas Journal of Microbiology**

### INSTRUÇÕES AOS AUTORES

#### **Regular Articles**

All portions of the manuscript must be typed one-half. The pages may not be numbered, those assigned Editorial office.

**The Title** should be a brief phrase describing the contents of the paper. The Title Page should include the authors' full names and affiliations, the name of the corresponding first author along with e-mail and phone number.

**The Abstract** should be informative and completely self-explanatory, briefly present the topic, state the scope of the experiments, indicate significant data, and point out major findings and conclusions. The abstract should be 100 to 250 words in length. Complete sentences, active verbs, and the third person should be used, and the abstract should be written in the past tense. Standard nomenclature should be used and abbreviations should be avoided. No literature should be cited.

Following the abstract, about 3 to 7 **key words** that will provide indexing references should be listed. A list of non-standard Abbreviations should be added. In general, non-standard abbreviations should be used only when the full term is very long and used often. Each abbreviation should be spelt out and introduced in parentheses the first time it is used in the text. Only recommended SI units should be used. Authors should use the solidus presentation (mg.ml<sup>-1</sup>). Standard abbreviations (such as ATP and DNA) need not be defined.

**The Introduction** should provide a clear statement of the problem, the relevant literature on the subject, and the proposed approach or solution. It should be understandable to colleagues from a broad range of scientific disciplines.

**Materials and Methods** should be complete enough to allow experiments to be reproduced. However, only truly new procedures should be described in detail; previously published procedures should be cited, and important modifications of published procedures should be mentioned briefly. Capitalize trade names and



include the manufacturer's name and address. Subheadings should be used. Methods in general use need not be described in detail.

**Results** should be presented with clarity and precision. The results should be written in the past tense when describing findings in the author(s)'s experiments. Previously published findings should be written in the present tense. Results should be explained, but largely without referring to the literature.

**Discussion**, speculation and detailed interpretation of data should not be included in the results but should be put into the discussion section. The Discussion should interpret the findings in view of the results obtained in this and in past studies on this topic. State the conclusions in a few sentences at the end of the paper. The Results and Discussion sections can include subheadings, and when appropriate, both sections can be combined.

**Conclusion.** The conclusion should include the most important idea of the experiment, the author's own findings, possible solutions to the problem, recommendations for further research, etc.

**The Acknowledgments** of people, grants, funds, etc should be brief.

**Tables** should be kept to a minimum and be designed to be as simple as possible. Tables are to be typed one-spaced throughout, including headings and footnotes. Tables should be prepared in Microsoft Word. Each table should be included directly in text and numbered consecutively in Arabic numerals and supplied with a heading and a legend. Tables should be self-explanatory without reference to the text. The details of the methods used in the experiments should preferably be described in the legend instead of in the text. The same data should not be presented in both table and graph forms or repeated in the text.

**Figures** should be numbered and are included directly in text. Graphics should be prepared using applications capable of generating high resolution GIF, TIFF, JPEG or PowerPoint before pasting in the Microsoft Word manuscript file. Use Arabic numerals to designate figures and upper case letters for their parts (Fig 1). Begin each legend with a title and include sufficient description so that the figure is

understandable without reading the text of the manuscript. Information given in legends should not be repeated in the text.

**References:** In the text, a reference identified by means of an author's name should be followed by the date of the reference in parentheses. When there are more than two authors, only the first author's name should be mentioned, followed by 'et al'. In the event that an author cited has had two or more works published during the same year, the reference, both in the text and in the reference list, should be identified by a lower case letter like 'a' and 'b' after the date to distinguish the works.

Examples: Davis (2007), Nijsten et al. (2008), (Hleba, 2011), (Kačániová and Haščík, 2006), (Buňka, 2003; Buňková, 2008a,b; Kmeť, 2004,2006), (Čuboň et al., 2009)

We respected APA style for references. Google scholar generates APA style automatically. References should be listed at the end of the paper in alphabetical order. Articles in preparation or articles submitted for publication, unpublished observations, personal communications, etc. should not be included in the reference list but should only be mentioned in the article text. Authors are fully responsible for the accuracy of the references.

NECESSARY point: If article has DOI number, it must be included to references part after cited article in original form. You can find some [examples prepared by CrossRef](#).

Examples of APA style:

Article: Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., ... & Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839), 487-491.

Book: Nunnally, J. C., Bernstein, I. H., & Berge, J. M. T. (1967). *Psychometric theory*(Vol. 226). New York: McGraw-Hill.

Html: Beringer, J., Arguin, J. F., Barnett, R. M., Copic, K., Dahl, O., Groom, D. E., ... & Eidelman, S. (2012). Review of particle physics. *Physical Review D*, 86(1).

Conference article: Pliszka, S. R., Greenhill, L. L., Crismon, M. L., Sedillo, A., Carlson, C., Connors, C. K., ... & DISORDER, H. (2000). The Texas Children's

Medication Algorithm Project: Report of the Texas Consensus Conference Panel on Medication Treatment of Childhood Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. Part I. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, 39(7), 908-919.

Guidelines from internet: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (2013).

### **Short Communications**

Short Communications are not limited in length. They should present a complete study that is more limited in scope than is found in full-length papers. Short Communications has the following differences: (1) Abstracts are limited to 150 words; (2) instead of a separate Materials and Methods section, experimental procedures may be incorporated into Figure Legends and Table footnotes; (3) Results and Discussion should be combined into a single section.

**Proofs and Reprints:** Electronic proofs about the printing will be published at the JMBFS website like the PDF file. Page proofs are considered to be the final version of the manuscript. With the exception of typographical or minor clerical errors, no changes will be made in the manuscript at the proof stage. Because the JMBFS will be published freely online to attract a wide audience, authors and others visitors will have free electronic access to the full text (in PDF) of the article. Authors and others visitors can freely download the PDF file from which they can print unlimited copies of their articles.

**Copyright:** Submission of a manuscript implies; that the work described has not been published before (except in the form of an abstract or as part of a published lecture, or thesis) that it is not under consideration for publication elsewhere. The originality and uniqueness of the article authors are responsible. All copyrights remain the author of the article.

**Fees and Charges:** Authors are not required to pay handling fee. Publication of articles in the Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences is free.

## Normas para Revista Brasileira de Plantas Mediciniais

### ARTIGO CIENTÍFICO

Os artigos deverão ser organizados em:

**TÍTULO:** Deverá ser claro e conciso, escrito apenas com a inicial maiúscula, negrito, centralizado, na parte superior da página. Se houver subtítulo, deverá ser em seguida ao título, em minúscula, podendo ser precedido de um número de ordem em algarismo romano. Os nomes comuns das plantas medicinais devem ser seguidos pelo nome científico (binômio latino e autor) entre parênteses.

**AUTORES:** Começar pelo último sobrenome dos autores por extenso (nomes intermediários somente iniciais, sem espaço entre elas) em letras maiúsculas, 2 linhas abaixo do título. Após o nome de cada autor deverá ser colocado um número sobrescrito que deverá corresponder ao endereço: instituição, endereço da instituição (rua e número ou Caixa Postal, cidade, sigla do estado, CEP, e-mail). Indicar o autor que deverá receber a correspondência. Os autores devem ser separados com ponto e vírgula.

**RESUMO:** Deverá constar da mesma página onde estão o título e os autores, duas linhas abaixo dos autores. O resumo deverá ser escrito em um único parágrafo, contendo objetivo, resumo do material e método, principais resultados e conclusão. Não deverá apresentar citação bibliográfica.

**Palavras-chave:** Deverão ser colocadas uma linha abaixo do resumo, na margem esquerda, podendo constar até cinco palavras.

**ABSTRACT:** Apresentar o título e resumo em inglês, no mesmo formato do redigido em português, com exceção do título, apenas com a inicial em maiúscula, que virá após a palavra ABSTRACT.

**Key words:** Abaixo do Abstract deverão ser colocadas as palavras-chave em inglês, podendo constar até cinco palavras.

**INTRODUÇÃO:** Na introdução deverá constar breve revisão de literatura e os objetivos do trabalho. As citações de autores no texto deverão ser feitas de acordo com os seguintes exemplos: Silva (1996); Pereira & Antunes (1985); (Souza & Silva, 1986) ou quando houver mais de dois autores Santos et al. (1996).

**MATERIAL E MÉTODO (CASUÍSTICA):** Deverá ser feita apresentação completa das técnicas originais empregadas ou com referências de trabalhos anteriores que as descrevam. As análises estatísticas deverão ser igualmente referenciadas. Na metodologia deverão constar os seguintes dados da espécie estudada: nome

popular; nome científico com autor e indicação da família botânica; nome do botânico responsável pela identificação taxonômica; nome do herbário onde a exsicata está depositada, e o respectivo número (Voucher Number); época e local de coleta, bem como, a parte da planta utilizada.

**RESULTADO E DISCUSSÃO:** Poderão ser apresentados separados, ou como um só capítulo, contendo a conclusão sumarizada no final.

**AGRADECIMENTO:** deverá ser colocado neste capítulo (quando houver).

**REFERÊNCIA:** As referências devem seguir as normas da ABNT 6023 e de acordo com os exemplos:

**Periódicos:**

AUTOR(ES) separados por ponto e vírgula, sem espaço entre as iniciais. Título do artigo. **Nome da Revista, por extenso**, volume, número, página inicial-página final, ano.

KAWAGISHI, H. et al. Fractionation and antitumor activity of the water-insoluble residue of *Agaricus blazei* fruiting bodies. **Carbohydrate Research**, v.186, n.2, p.267-73, 1989.

**Livros:**

AUTOR. **Título do livro**. Edição. Local de publicação: Editora, Ano. Total de páginas.

MURRIA, R.D.H.; MÉNDEZ, J.; BROWN, S.A. **The natural coumarins: occurrence, chemistry and biochemistry**. 3.ed. Chinchester: John Wiley & Sons, 1982. 702p.

**Capítulos de livros:**

AUTOR(ES) DO CAPÍTULO. Título do Capítulo. In: AUTOR (ES) do LIVRO. **Título do livro**: subtítulo. Edição. Local de Publicação: Editora, ano, página inicial-página final.

HUFFAKER, R.C. Protein metabolism. In: STEWARD, F.C. (Ed.). **Plant physiology: a treatise**. Orlando: Academic Press, 1983. p.267-33.

**Tese ou Dissertação:**

AUTOR. **Título em destaque**: subtítulo. Ano. Total de páginas. Categoria (grau e área de concentração) - Instituição, Universidade, Local.

OLIVEIRA, A.F.M. **Caracterização de Acanthaceae medicinais conhecidas como anador no nordeste do Brasil**. 1995. 125p. Dissertação (Mestrado - Área de Concentração em Botânica) - Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

**Trabalho de Evento:**

AUTOR(ES). Título do trabalho. In: Nome do evento em caixa alta, número, ano, local. **Tipo de publicação em destaque...** Local: Editora, ano. página inicial-página final.

VIEIRA, R.F.; MARTINS, M.V.M. Estudos etnobotânicos de espécies medicinais de uso popular no Cerrado. In: INTERNATIONAL SAVANNA SYMPOSIUM, 3., 1996, Brasília. **Proceedings...** Brasília: Embrapa, 1996. p.169-71.

#### **Publicação**

#### **Eletrônica:**

AUTOR(ES). Título do artigo. **Título do periódico em destaque**, volume, número, página inicial-página final, ano. Local: editora, ano. Páginas. Disponível em: <<http://www.....>>. Acesso em: dia mês (abreviado) ano. PEREIRA, R.S. et al. Atividade antibacteriana de óleos essenciais em cepas isoladas de infecção urinária. **Revista de Saúde Pública**, v.38, n.2, p.326-8, 2004. Disponível em:<http://www.scielo.br>. Acesso em: 18 abr. 2005.

Não citar resumos e relatórios de pesquisa, a não ser que a informação seja muito importante e não tenha sido publicada de outra forma. Comunicações pessoais devem ser colocadas no rodapé da página onde aparecem no texto e evitadas se possível. Devem ser também evitadas citações do tipo: Almeida (1994) citado por Souza (1997).

**TABELAS:** Devem ser inseridas no texto, com letra do tipo Arial 10, espaço simples. A palavra TABELA (Arial 12) deve ser em letras maiúsculas, seguidas por algarismo arábico; já quando citadas no texto devem ser em letras minúsculas (Tabela).

**FIGURAS:** As ilustrações (gráficos, fotográficas, desenhos, mapas) devem ser em letras maiúsculas seguidas por algarismo arábico, Arial 12, e inseridas no texto. Quando citadas no texto devem ser em letras minúsculas (Figura). As legendas e eixos devem ser em Arial 10, enviadas em arquivos separados, com resolução 300 DPI, 800x600, com extensão JPG ou TIFF, para impressão de publicação.

**Processo de avaliação:** Os manuscritos são analisados por, pelo menos, dois pareceristas, segundo um roteiro de análise baseado principalmente no conteúdo científico. Os pareceristas recomendarão a aceitação com ou sem necessidade de retornar; recusa, ou sugerir reformulações, e que, neste caso, o artigo reformulado retornará ao parecerista até que a avaliação seja concluída. Quando no mínimo 2 pareceristas aprovarem, sem necessidade de retornar, o artigo estará pronto para ser publicado e o autor receberá a carta de aceite bem como as instruções para pagamento dos custos de tramite (R\$300 reais)\*. Os nomes dos pareceristas permanecerão em sigilo, omitindo-se também perante estes os nomes dos autores.

\* Somente os artigos aprovados que foram submetidos a partir de 1º de abril de 2013 terão custo para publicação.

**Direitos autorais:** Ao encaminhar um manuscrito para a RBPM os autores devem estar cientes de que, se aprovado para publicação, o copyright do artigo, incluindo os direitos de reprodução em todas as mídias e formatos, deverá ser concedido exclusivamente para as Memórias.

**ATENÇÃO:** Artigos que não estiverem de acordo com essas normas serão devolvidos.

**Observação:** São de exclusiva responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos. Contudo, reserva-se ao Conselho Editorial, o direito de sugerir ou solicitar modificações que julgarem necessárias.