

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE ARAÇATUBA

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
EXTRATOS ETANÓLICOS DE
Curcuma longa* E *Bixa orellana

Juliana Campos Diniz Guedes
Engenheira de Alimentos

ARAÇATUBA – SP

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CAMPUS DE ARAÇATUBA

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
EXTRATOS ETANÓLICOS DE
Curcuma longa* E *Bixa orellana

Juliana Campos Diniz Guedes

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba – Unesp, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

Orientadora: Profa. Associada Elisa Helena Giglio Ponsano

ARAÇATUBA – SP

2019

G924c	<p>Guedes, Juliana Campos Diniz</p> <p>Caracterização química e atividade biológica de extratos etanólicos de <i>Curcuma longa</i> e <i>Bixa orellana</i> / Juliana Campos Diniz Guedes. -- Araçatuba, 2019</p> <p>67 f. : il., tabs.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba</p> <p>Orientadora: Profa. Associada Elisa Helena Giglio Ponsano</p> <p>1. microbiologia. 2. antioxidantes. 3. bactérias gram-negativas. 4. bactérias gram-positivas. 5. alimentos aditivos. I. Título.</p>
-------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATOS
ETANÓLICOS DE Curcuma longa E Bixa Orellana

AUTORA: JULIANA CAMPOS DINIZ GUEDES

ORIENTADORA: ELISA HELENA GIGLIO PONSANO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIA ANIMAL, área: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. ELISA HELENA GIGLIO PONSANO
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp



Profa. Dra. MARCIA MARINHO
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp



Profa. Dra. APARECIDA DE FATIMA MICHELIN
Curso de Farmácia / Universidade Paulista/UNIP- Câmpus de Araçatuba

Araçatuba, 06 de junho de 2019.

DADOS CURRICULARES

JULIANA CAMPOS DINIZ GUEDES – Engenheira de Alimentos formada pela Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG (UFLA). Desenvolveu pesquisas na área de Microbiologia e na subárea Café e Saúde. Realizou estágio no laboratório físico-químico da empresa Constellation Wine U. S. - Clos du Bois, nos Estados Unidos, durante 6 meses, contribuindo para o controle de qualidade na produção de vinhos. Realizou estágio nas empresas Yakult S/A Indústria e Comércio, Coordenadoria de Assistência Técnica Integral (CATI) e Polo Regional de Desenvolvimento Tecnológico dos Agronegócios (PRDTAVP). Atuou como consultora técnica comercial com ênfase em monitoramento analítico em indústrias de alimentos (carnes e derivados, laticínios, panificações e bebidas). Tem experiência na área de controle de qualidade e controle de processos industriais. Atualmente é mestranda na área de Medicina Preventiva e Produção Animal, com ênfase em Tecnologia de Produtos de Origem Animal, no programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária (FMVA) - UNESP Araçatuba, sob orientação da professora Associada Elisa Helena Giglio Ponsano. Participou de eventos com apresentação de trabalhos derivados de suas pesquisas.

Dedico

*A Letícia e Henrique,
minhas fontes de superação.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado força todos esses anos em que morei em Araçatuba.

À Letícia e ao Henrique, pela vida, amor e por serem responsáveis pela minha vontade em buscar conhecimento.

Ao Felipe, pelo companheirismo, incentivo e dedicação com nossa família.

Aos meus pais, Rachel e Mauro, pelo amor incondicional, ajuda e esforço para concluir esse projeto.

Ao meu irmão, Thiago, por torcer por mim e me mostrar novos caminhos para viver.

Às famílias Campos, Diniz e Guedes, por torcerem por mim.

À Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Aos professores do programa de pós-graduação em Ciência animal da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA) por contribuírem com minha formação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida.

À Universidade Virtual do Estado de São Paulo (Univesp) pela bolsa de estudos e oportunidade de aprendizado.

Aos funcionários da Unesp, em especial ao Carlos, pela ajuda com o preparo das plantas.

À Professora Roberta Hilsdorf Piccoli do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal de Lavras (UFLA) por me receber com tanto carinho e atenção. Sem ela, esse trabalho não teria o mesmo valor.

A Heloísa Martins e Juliana Junqueira da UFLA, pelo auxílio na realização das análises microbiológicas.

À Embrapa de Fortaleza, ao Pesquisador Guilherme Juliao Zocolo e a Lícia Luz, pelo auxílio na realização das análises de espectrometria de massa.

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), à Professora Cinthia Baú Betim Cazarin e à aluna Cíntia Reis Ballard pelo apoio na realização das análises antioxidantes.

À UNESP, campus de Botucatu, e ao Departamento de Botânica pela identificação das plantas, em especial à Leonice Aparecida Garcia, técnica do laboratório e à Professora Ana Paula Fortuna Perez.

Agradeço com muita gratidão ao Centro de Convivência Infantil (CCI Unesp) pelo acolhimento da Letícia nestes anos, com todo carinho e competência educacional. Um exemplo de qualidade e profissionalismo.

À amiga Juliana Sedlacek, pela amizade e pela ajuda na execução desse projeto.

Ao amigo Thiago Grassi pelo apoio, amizade e acolhimento desde os primeiros momentos de ingresso na Unesp.

Ao amigo Dielson Silva que me ensinou a técnica e me ajudou com importantes sugestões durante a execução do projeto.

Dielson, Thiago e Juliana, amizades construídas que levarei para sempre comigo. Obrigado pelo esforço e dedicação com esse projeto.

À toda equipe do Laboratório de Alimentos, em especial Dayse e Milena.

Aos membros da banca da qualificação e de defesa, Professor Manoel Garcia Neto, Professora Cárís Maroni Nunes, Professora Márcia Marinho e Professora Aparecida de Fátima Michelin, pelas contribuições e melhorias desse trabalho.

Agradeço especialmente a minha orientadora Elisa Giglio Ponsano pela oportunidade de executar esse projeto e pelos ensinamentos durante todo esse período.

Esta pesquisa me despertou para o mundo das plantas medicinais e para novos conhecimentos em diversas áreas. Sou eternamente grata por essa oportunidade que Deus me concedeu.

“A inteligência é livre para ir aonde desejar, mesmo até onde as moléculas não conseguem”

Deepak Chopra

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATOS ETANÓLICOS DE *Curcuma longa* E *Bixa orellana*

RESUMO

O objetivo deste estudo foi investigar a composição química e as atividades antimicrobiana e antioxidante dos extratos etanólicos de *Curcuma longa* e *Bixa orellana*, na busca por substituintes aos aditivos sintéticos utilizados na indústria de alimentos. Pela espectrometria de massa (GC-MS) foram identificados bisdemetoxicurcumina, demetoxicurcumina e curcumina no extrato de *C. longa* e prunina e naringenina no extrato de *B. orellana*. *C. longa* apresentou atividade antimicrobiana frente a *Clostridium sporogenes* e *Staphylococcus aureus*, com concentração bactericida mínima (CBM) de 25 mg/mL e 156 µg/mL, respectivamente. O extrato de *B. orellana* apresentou CBM de 50 mg/mL para *C. sporogenes* e 625 µg/mL para *S. aureus*. Nenhum dos extratos apresentou atividade bactericida para *Escherichia coli* e *Salmonella Typhimurium*. A atividade antioxidante dos extratos foi evidenciada pelos métodos Poder Antioxidante por Redução Férrica (FRAP) e Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio (ORAC). O extrato de *B. orellana* apresentou maior atividade antioxidante pelos métodos FRAP e ORAC (277,70 e 455,17 mM trolox equivalente/g, respectivamente) do que o extrato de *C. longa* (129,74 e 217,98 mM trolox equivalente/g, respectivamente). Os efeitos biológicos dos extratos etanólicos de *C. longa* e *B. orellana* revelados no presente estudo apontaram seu potencial para a utilização na indústria de alimentos como uma alternativa aos aditivos sintéticos.

Palavras-chave: Antibacterianos. Antioxidantes. Aditivos alimentares. Bactérias anaeróbias. Bactérias aeróbias. Bactérias gram-negativas. Bactérias gram-positivas. Espectrometria de massas. Curcumina. Flavononas.

CHEMICAL CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF *Curcuma longa* and *Bixa orellana* ETHANOLIC EXTRACTS

ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the chemical composition and the antimicrobial and antioxidant activities of *Curcuma longa* and *Bixa orellana* ethanolic extracts, in the search for alternatives to the synthetic additives used in the food industry. Mass spectrometry (GC-MS), identified bisdemethoxycurcumin, demethoxycurcumin and curcumin in the extract of *C. longa* and prunin and naringenin in the extract of *B. orellana*. *C. long* showed antimicrobial activity against *Clostridium sporogenes* and *Staphylococcus aureus*, with a minimum bactericidal concentration (MBC) of 25 mg/mL and 156 µg/mL, respectively. MBC of *B. orellana* extract was 50 mg/mL for *C. sporogenes* and 625 µg/mL for *S. aureus*. None of the extracts showed bactericidal activity against *Escherichia coli* and Salmonella Typhimurium. The antioxidant activity of the extracts was evidenced by the methods Iron Reduction Antioxidant Power (FRAP) and Oxygen Radical Absorption Capacity (ORAC). *B. orellana* extract had higher antioxidant activity by FRAP and ORAC (277.70 and 455.17 mM trolox equivalent/g, respectively) than *C. longa* extract (129.74 and 217.98 mM trolox equivalent/g, respectively). The biological effects of *C. longa* and *B. orellana* ethanolic extracts revealed in this study indicated their potential as an alternative to synthetic additives used in the food industry.

Keywords: Antibacterials. Antioxidants. Food additives. Anaerobic bacteria. Aerobic bacteria. Gram-negative bacteria. Gram-positive bacteria. Mass spectrometry. Curcumin. Flavonones.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Cromatograma do extrato etanólico bruto do rizoma de *Curcuma longa* nos modos negativo (a) e positivo (b) de ionização47
- Figura 2 - Cromatograma do extrato etanólico bruto do fruto da *Bixa orellana* nos modos negativo (a) e positivo (b) de ionização48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Atividade antioxidante dos extratos etanólicos brutos da <i>Curcuma longa</i> e <i>Bixa orellana</i>	50
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS	15
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Doenças transmitidas por alimentos	17
2.2 Bactérias Gram-positivas	19
2.3 Bactérias Gram-negativas	20
2.4 Antimicrobianos	22
2.4.1 Medida da atividade antimicrobiana	24
2.5 Antioxidantes em Alimentos	25
2.5.1 Medida da atividade antioxidante	25
2.6 Plantas com atividade biológica	27
2.6.1 <i>Curcuma longa</i>	27
2.6.2 <i>Bixa orellana</i>	28
2.7 Compostos fenólicos	29
2.8 Caracterização de compostos químicos de plantas	30
3 OBJETIVO	33
REFERÊNCIAS	34
CAPÍTULO 2 - ARTIGO CIENTÍFICO	43
1 INTRODUÇÃO	45
2 RESULTADOS	47
2.1 Composição química dos extratos de <i>Curcuma longa</i> e <i>Bixa orellana</i>	47
2.2 Atividade antimicrobiana dos extratos de <i>Curcuma longa</i> e <i>Bixa orellana</i>	49
2.3 Atividade antioxidante dos extratos de <i>Curcuma longa</i> e <i>Bixa orellana</i>	49
3. DISCUSSÃO	51
3.1 Composição química dos extratos de <i>Curcuma longa</i> e <i>Bixa orellana</i>	51
3.2 Atividade antimicrobiana dos extratos de <i>Curcuma longa</i> e <i>Bixa orellana</i>	53
3.3 Atividade antioxidante dos extratos de <i>Curcuma longa</i> e <i>Bixa orellana</i>	55
4 MATERIAL E MÉTODOS	56
4.1 Plantas	56

4.2 Produção do extrato etanólico	56
4.3 Caracterização química dos extratos	56
4.4 Determinação da atividade antimicrobiana para micro-organismos aeróbios	56
4.5 Determinação da atividade antimicrobiana para micro-organismos anaeróbios .	57
4.6 Determinação da atividade antioxidante	59
4.6.1 Capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC)	59
4.6.2 Poder antioxidante por redução férrica (FRAP)	59
4.7 Análise estatística	60
5 CONCLUSÕES	61
REFERÊNCIAS	62

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INTRODUÇÃO

A segurança dos alimentos é um problema de saúde pública cada vez mais importante (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003), e sua responsabilidade deve ser atribuída a todos os envolvidos na cadeia produtiva – governo, produtores, indústrias, fornecedores e consumidores (DOMENECH; MARTORELL, 2016).

Todos os anos, milhões de pessoas adoecem e muitas morrem em decorrência do consumo de alimentos inseguros (NEWELL et al., 2010). A incidência de doenças transmitidas por alimentos (DTA) aumentou significativamente nos últimos anos, causando perdas econômicas e sociais (LANDETE et al., 2017).

Cerca de um terço das populações dos países desenvolvidos é afetado por DTA a cada ano. Nos Estados Unidos (EUA), 48 milhões de casos são relatados por ano, resultando em 3.000 mortes (COHEN; OLSON, 2016), e o problema é ainda mais disseminado nos países em desenvolvimento (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003). No Brasil, em 2018 foram notificados aproximadamente 500 surtos de DTA, 6.803 mil indivíduos ficaram doentes e 9 vieram a óbito (BRASIL, 2018).

Essas diferenças ocorrem em razão do sistema de vigilância para rastrear e monitorar as DTA no Brasil ainda ser falho, sendo necessária uma maior integração dos órgãos públicos com os consumidores (BRASIL, 2010). Nos EUA, a prática de novos métodos de vigilância vem melhorando a qualidade, a quantidade e a pontualidade dos seus dados (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2018).

Em resposta a esses surtos de doenças, o mercado global apresenta uma demanda por melhorias na segurança microbiológica dos alimentos (NEWELL et al., 2010; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002). Atualmente a indústria alimentícia encontra-se desafiada a implementar estratégias de controle para evitar a contaminação por patógenos (BYRD-BREDBENNER et al., 2015).

Os extratos de plantas representam uma alternativa para a indústria de alimentos, uma vez que apresentam características antimicrobianas e antioxidantes que podem inibir o crescimento de patógenos e prolongar a vida útil dos produtos alimentícios (GÓMEZ, et al., 2012; MARTINS; PETROPOULOS; FERREIRA; 2016; SELVAM et al., 2015; SHARMA et al., 2017; TANDON; YADAV, 2017; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1999).

Neste estudo, tivemos como objetivo testar os extratos de *Curcuma longa* e *Bixa orellana* contra os patógenos mais comuns nos surtos de DTA.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Doenças transmitidas por alimentos

Doenças transmitidas por alimentos (DTA) são aquelas causadas pela ingestão de alimentos e/ou água contaminados. Existem mais de 250 tipos de DTA e a maioria é causada por bactérias, vírus e parasitas. Nas últimas duas décadas, as DTA aumentaram significativamente tornando-se um problema de saúde pública em muitos países. Ocorrências globais como crescimento da população, pobreza, exportação de alimentos e de rações animais contribuíram para este aumento (BRASIL, 2019a).

Considera-se surto de DTA quando duas ou mais pessoas apresentam doença ou sintomas semelhantes após ingerirem alimentos e/ou água contaminados (BRASIL, 2019a). *Escherichia coli* e *Salmonella* spp, bactérias Gram-negativas, estão entre os principais patógenos associados aos surtos de DTA no Brasil, representando 63,2% dos surtos em 2017 (BRASIL, 2018).

E. coli são encontradas frequentemente nos intestinos dos seres humanos e dos animais. Algumas são comensais, coexistem em benefícios mútuos com o hospedeiro, enquanto outras são patogênicas (BOULIANNE, et al., 2016; MAINIL, 2013). Dentre as espécies de *Salmonella*, a *S. Typhimurium* (*Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Typhimurium) é considerada o segundo sorotipo mais comum, após *Salmonella Enteritidis* (*Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Enteritidis). É encontrada em humanos e é responsável, em todo o mundo, por cerca de um terço de todos os casos de DTA (BAGHERYAN et al., 2016).

Vários são os fatores que contribuem para a transmissão de doenças por alimentos: refrigeração insuficiente, armazenamento a temperaturas elevadas, cocção e reaquecimento inapropriados, preparo de alimentos várias horas antes de servi-los, contaminação cruzada, falta de higiene dos manipuladores, falta de higiene do ambiente, matéria-prima contaminada. A contaminação é mais comum em carne bovina, suína, aves e seus produtos e em produtos à base de ovos crus (BRASIL, 2010).

S. Typhimurium tem sido o sorotipo mais prevalente em aves na América Latina, sendo encontrada dentro da indústria de frangos ou em produtos de frango no varejo. O crescimento mundial do consumo de aves contribui para o aumento da disseminação desse patógeno (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2010; TERZOLO, 2011).

Algumas bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus* spp e *Clostridium* spp também provocaram um número significativo de DTA nos últimos anos; foram 124 surtos somente em 2017 (BRASIL, 2018). Existe uma grande diversidade entre as cepas de *Staphylococcus aureus*. Algumas estão presentes como colonizadores assintomáticos, outras causam infecções leves, e outras ainda podem causar doenças fatais e graves (OTLER; FRENCH, 2010).

Em um estudo com 6.697 infecções em 59 hospitais nos EUA, o *S. aureus* foi o isolado bacteriano mais comum, representando 23% de todos os registros, e foi mais fortemente associado com a morte do que qualquer outro patógeno bacteriano (THWAITES et al., 2011). O controle deste patógeno tem sido dificultado pela aquisição contínua de resistência aos antibióticos nos últimos anos (CHEN; HUANG, 2014; OTTLER; FRENCH, 2010).

Hoje, o *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) é um dos patógenos humanos com grande relevância no ambiente hospitalar e também está associado a infecções em pessoas saudáveis (RICE, 2006). Recentemente, um novo reservatório de MRSA foi identificado na produção de alimentos de origem animal, representando mais uma ameaça potencial para a saúde humana (KLUYTMANS, 2010). O MRSA causa mais de 80.000 mil infecções graves e 11.000 mortes por ano e é líder na causa de infecções associadas à saúde (KAYE et al., 2008).

Alimentos submetidos a tratamento térmico, após um período em condições que permitam o crescimento, podem não apresentar células viáveis de *S. aureus*, que são destruídas pelo aquecimento e, mesmo assim, conter toxinas estafilocócicas, que são altamente resistentes ao calor (SILVA et al., 2007). A enterotoxigenicidade do *S. aureus* mais comum ocorre devido ao processamento, à manipulação e ao armazenamento inadequados dos alimentos, sendo responsável por dois terços dos surtos globais de doenças transmitidas por alimentos (NAGARAJ et al., 2014).

Dentre as diversas doenças veiculadas por alimentos, destaca-se o botulismo, causado pela ingestão da neurotoxina botulínica produzida pela bactéria *Clostridium botulinum* e que pode levar à morte por paralisia da musculatura respiratória (BRASIL, 2019b). A maioria dos surtos de botulismo é causada pela ingestão de embutidos, pois possuem ambiente propício para o desenvolvimento deste micro-organismo. Nestes produtos, o controle desse patógeno é feito pela adição de nitrito, que também confere cor e aumento da vida útil. No entanto, em 2015, a Organização Mundial da Saúde (OMS) emitiu um boletim fazendo advertências sobre o potencial cancerígeno desse composto (AS CORES, 2015; OMS, 2015), o que justifica a necessidade de se estudar novos antimicrobianos para substituí-los.

Com base no exposto, para este estudo foram escolhidas as bactérias patogênicas que apresentaram maior frequência de surtos por DTA no Brasil nos últimos três anos, que são *E. coli*, *Salmonella* spp., *S. aureus* e *Clostridium* spp.

2.2 Bactérias Gram-Positivas

Conhecer as diferenças estruturais das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas é de extrema importância para o estudo da ação dos antimicrobianos. Identificar as características específicas de cada patógeno também é fundamental para entender a atividade do antimicrobiano na célula microbiana.

As bactérias Gram-positivas possuem a parede celular rígida e espessa, composta por muitas camadas de peptidoglicano. O espaço periplasmático existente entre a parede celular e a membrana plasmática de uma bactéria gram-positiva contém ácido lipoteicoico e ácidos teicoicos, que consistem em um álcool (como o glicerol ou ribitol) e fosfato. Os ácidos teicoicos regulam o movimento de íons positivos para dentro e para fora da célula. Eles também são responsáveis pelo crescimento celular, impedindo a ruptura extensa da parede e a possível lise celular (SILVA et al., 2007; TORTORA; FUNKE; CASE, 2017). *Clostridium* spp e *Staphylococcus* spp são micro-organismos que possuem essas características. *C. sporogenes*, micro-organismo Gram-positivo, tem sido utilizado como modelo de pesquisa para o *C. botulinum* e para a validação de processos térmicos para alimentos devido a sua resistência térmica ser maior que das espécies de *C. perfringens* e *C. botulinum* (BROWN, TRAN-DINH, and CHAPMAN, 2012). *C. sporogenes* é um micro-organismo

esporulado, anaeróbico obrigatório, e está incluído no grupo de Clostrídios Sulfito Redutores a 46 °C (MARTINS, 2016). Apresenta grande semelhança genética e fisiológica com *C. botulinum*, causador do botulismo, e difere deste por não produzir neurotoxinas. É um micro-organismo putrefativo, responsável pela decomposição de proteínas com produção de amônia e ácido sulfúrico (BROWN, 2000).

Staphylococcus aureus é um patógeno bacteriano Gram-positivo em forma de *coccus*, imóvel, anaeróbico facultativo, não formador de esporos, catalase positivo, mesófilo, que requer temperatura de crescimento variando entre 7 °C a 47,8 °C (temperatura ótima de 35 a 37 °C) e pH para crescimento de 4,0 a 9,8 (pH ótimo entre 6,0 e 7,0), produtor de enterotoxina entre 10 °C a 46 °C (FRANCO; LANDGRAF, 1996; MASALHA et al., 2001; ZELENY et al., 2015). Essas características possibilitam que esta bactéria cresça em uma grande variedade de alimentos (SCHMITT; SCHULER-SCHMID, 1990).

As doenças de origem alimentar provocada por *S. aureus* está relacionada à produção de enterotoxinas. As enterotoxinas estão divididas sorologicamente em cinco tipos principais, de A a E. As toxinas estafilocócicas são estáveis ao calor e capazes de resistir em fervura por várias horas não desnaturando durante o cozimento e, por isso apresentam risco à saúde (FORSYTHE, 2013).

As cepas de *S. aureus* eram vulneráveis à penicilina, na década de 1940 mas, em 1944, começaram a desenvolver resistência. Em 1959, 80% das cepas tornaram-se resistentes devido à produção de penicilinase, capaz de hidrolisar o anel betalactâmico da penicilina, tornando-a inativa (SANTOS et al., 2007). Em 1960, a meticilina foi lançada no mercado como alternativa para cepas produtoras de penicilinase, uma vez que essa droga não sofre ação dessa enzima. Porém, em 1961, relatos de cepas também resistentes à meticilina passaram a ser descritos e foram identificados os denominados *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) (RICE, 2006). Trata-se de um micro-organismo com elevada resistência aos antimicrobianos prescritos para o tratamento de infecções graves (ALVAREZ; LABARCA; SALLES, 2010).

2.3 Bactérias Gram-Negativas

As paredes celulares das bactérias Gram-negativas são mais complexas quando comparadas às bactérias Gram-positivas. Elas são compostas por uma membrana externa e um espaço periplasmático contendo pequena quantidade de peptidoglicano (QUINN, et al., 2018). O periplasma contém uma alta concentração de enzimas de degradação e proteínas de transporte. A membrana externa da célula Gram-negativa contém lipopolissacarídeos (LPS), lipoproteínas e fosfolipídeos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017; QUINN, et al., 2018).

O LPS é uma molécula grande e complexa que contém lipídeos e carboidratos e que consiste em três componentes: (1) lipídeo A, (2) um cerne polissacarídeo e (3) um polissacarídeo O. O lipídeo A encontra-se na parede superior da membrana externa e é liberado quando as bactérias Gram-negativas morrem, funcionando como uma endotoxina, responsável pelos sintomas associados a infecções como febre, dilatação de vasos sanguíneos, choque e formação de coágulos sanguíneos. O cerne polissacarídico é ligado ao lipídeo A e contém açúcares incomuns, sendo responsável por fornecer estabilidade. O polissacarídeo O se estende para fora do cerne polissacarídico e é composto por moléculas de açúcares, funcionando como antígeno, diferenciando assim espécies de bactérias Gram-negativas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

A membrana externa funciona como barreira para moléculas grandes (proteínas) e é permeável a moléculas menores como purinas e aminoácidos, sendo, desta maneira, seletivamente permeável a moléculas com base em sua carga elétrica e peso molecular. As moléculas passam através de canais de difusão formados por proteínas especiais chamadas porinas, que atravessam a membrana externa. Várias porinas são específicas para diferentes tipos ou classes de moléculas pequenas, e algumas permitem a passagem de moléculas maiores (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2007). *Escherichia coli* e *Salmonella spp* são exemplos de micro-organismos com essas estruturas.

Escherichia coli é uma bactéria Gram-negativa, não esporulada, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, e coloniza o trato gastrointestinal de mamíferos e aves, sendo de fácil disseminação em meios como água, solo e alimentos, podendo infectar humanos e animais (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; MAINIL, 2013). Faz parte do grupo dos coliformes fecais, são aeróbias ou anaeróbias

facultativas, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 a 48 horas a 37 °C (SILVA et al., 2007).

Para seu crescimento e sua sobrevivência no alimento, a bactéria requer a interação de diversos fatores intrínsecos e extrínsecos. Desenvolve-se em uma temperatura que pode variar de 7 a 46 °C, possui pH ótimo de 6,0 - 7,0 e atividade de água mínima de 0,95. É sensível ao aquecimento, dependendo da composição do alimento, de pH e atividade de água, sendo destruída a 60 °C por poucos segundos (HOLT et al., 1994). *E. coli* é classificada de acordo com sua patologia em: enteropatogênica (EPEC), enterotoxigênica (ETEC), extraintestinal (EXPEC), enterohemorrágica (EHEC), produtora de toxina *Shiga* (STEC), uropatogênica (UPEC), enteroinvasiva (EIEC), enteroagregativa (EAEC), além de outras como, por exemplo, enteropatogênica para suínos (PEPEC) e patogênica para aves (APEC) (KAPER et al., 2004).

As salmonelas são bacilos Gram-negativos pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, imóveis ou móveis por meio de flagelos peritríquios, mesófilos, capazes de crescer entre 5 °C a 45 °C (temperatura ótima de 37 °C), pH entre 4 a 9 (pH ótimo 7) e se comportam como patógenos intracelulares facultativos (HOLT et al., 1994; MADIGAN et al., 2010). O gênero *Salmonella* divide-se em duas espécies: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*, sendo identificados 2.610 sorotipos. *Salmonella bongori* possui 23 sorotipos e *Salmonella enterica* possui 2.587, distribuídos entre suas seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica* (GUIBOURDENCHE et al., 2010).

2.4 Antimicrobianos

Os antimicrobianos são substâncias que têm a capacidade de destruir ou inibir o crescimento de micro-organismos (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017; JABERIAN; PIRI; NAZARI, 2013). Diversos fatores devem ser considerados para avaliar a sua eficiência (MADIGAN et al., 2010; WEN et al., 2003):

1. O tamanho da população microbiana;
2. As características de resistência da população microbiana;
3. As propriedades do composto onde estão os micro-organismos;

4. A concentração do antimicrobiano
5. O tempo de exposição ao antimicrobiano;
6. A metodologia.

O uso indiscriminado dessas substâncias vem aumentando em todo mundo a resistência microbiana, que é a capacidade de um micro-organismo em resistir à ação de um agente antimicrobiano. Representa uma adaptação do micro-organismo ao seu ambiente e resulta em redução ou eliminação da eficácia do agente antimicrobiano (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2018; SHIN et al., 2015).

Atualmente, a resistência microbiana é considerada uma das maiores preocupações em saúde pública, gerando consequências para a população como, por exemplo, a ineficácia dos tratamentos, o prolongamento das doenças e o aumento da taxa de mortalidade (SHIN et al., 2015). Para aquisição de resistência, a bactéria pode alterar seu DNA por mutação no DNA nativo ou por introdução de um DNA estranho, tornando-se carreadora de genes de resistência proveniente de outras espécies de bactérias (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA 2007; JOLIVET-GOUGEON et al., 2011; MADIGAN et al., 2010). Existem quatro principais mecanismos de resistência aos agentes antimicrobianos: alteração na permeabilidade da membrana, alteração do sítio de ação, bomba de efluxo e mecanismo enzimático (KUMAR, VARELA, 2013; RICE, BONOMO, 2005; RICE 2006). A permeabilidade da membrana celular interfere na entrada do antimicrobiano para o interior da célula. A composição da membrana externa nas bactérias Gram-negativas (fosfolípidios, lipoproteína e lipopolissacarídeos) confere uma penetração demorada do antimicrobiano através das porinas, que estabelecem canais hidrofílicos específicos pelos quais as substâncias passam para o espaço periplasmático e para o interior da célula. As bactérias podem alterar as porinas específicas da membrana externa, impedindo a penetração do antimicrobiano até seu local de ação (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA 2007; MADIGAN et al., 2010).

A alteração do sítio de ação do antimicrobiano na célula microbiana ocorre pela transformação do local-alvo. As bactérias podem adquirir genes transportados por plasmídeos (pequenas moléculas com código genético que sofrem replicação, concentrado em uma mesma célula de bactéria) ou por *transposons* (segmentos de

DNA capazes de mudar de posição dentro do genoma) e codificar enzimas que inativam os alvos ou alterem a ligação com os antimicrobianos (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2007). Algumas bactérias adquirem resistência pelas bombas de efluxo, proteínas existentes nas membranas, que fazem o bombeamento ativo de antimicrobianos do meio intracelular para o extracelular (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2007; LAUDY; KULINSKA; TYSKI, 2017). Já a resistência enzimática ocorre quando bactérias produzem enzimas que degradam e inativam os antimicrobianos. Um exemplo clássico deste mecanismo é a produção de β -lactamase (penicilase), que hidrolisa o anel β -lactâmico das penicilinas, destruindo o local onde os antimicrobianos dessa classe ligam-se às bactérias (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2007).

Com a resistência por múltiplos mecanismos, torna-se cada vez mais difícil o controle de patógenos. Assim, novas estratégias terapêuticas são urgentemente necessárias para resolver o problema mundial de saúde pública (WANG et al., 2017; WHITE; BARBER; STOVER, 2017).

2.4.1 Medida da Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana é avaliada pela Concentração Mínima Inibitória (CMI) ou pela Concentração Mínima Bactericida (CMB). A CMI representa a menor concentração do agente antimicrobiano capaz de inibir completamente o crescimento de um micro-organismo em um tempo específico. A CMB é a menor concentração que resulta na morte microbiana, ou seja, a concentração bactericida (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2012).

As metodologias de determinação de CMI e CMB são preconizadas pelo Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI) com base no Estudo Colaborativo Internacional (Internatinal Collaborative Study). O CLSI é uma organização sem fins lucrativos que reúne conhecimentos da comunidade mundial de laboratórios para o avanço da medicina laboratorial por meio do desenvolvimento e da implementação de padrões laboratoriais (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2012).

Os métodos mais utilizados para avaliar a susceptibilidade *in vitro* de bactérias aeróbias ou anaeróbias facultativas a agentes antimicrobianos são os ensaios de disco-difusão (Documento M02 - A12 – CLSI; CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2015b), diluição (macrodiluição e microdiluição) em caldo e diluição em ágar (Documento M07- A10 – CLSI; CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2015a). Para o crescimento de bactérias anaeróbias é utilizado o método de diluição (M11 – A8 – CLSI; CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2012).

O método de disco-difusão é qualitativo e seu princípio se baseia na difusão do antimicrobiano na superfície do ágar a partir de um disco impregnado com o antimicrobiano (GOMEZ et al., 2012). Já o método de diluição é quantitativo. Uma série de tubos ou microplacas são preparados com diferentes concentrações dos agentes antimicrobianos e incubados com a solução padrão do micro-organismo a ser testado. Neste método, a CMI é identificada pela menor concentração do antimicrobiano capaz de inibir o crescimento do inóculo e a CMB é identificada pela menor concentração que causa a morte do micro-organismo (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2015a).

2.5 Antioxidantes em Alimentos

A oxidação biológica é determinante na qualidade dos produtos alimentícios, interferindo na cor, adstringência, aroma e sabor dos alimentos. Os danos oxidativos induzidos pelos radicais livres compreendem modificações nos lipídeos insaturados, nas proteínas, nos carboidratos e nas vitaminas presentes nos alimentos (BIANCHI; ANTUNES; 1999; KUMAZAWA; HAMASAKA; NAKAYAMA, 2004).

Os radicais livres são moléculas ou íons que apresentam um ou mais elétrons não pareados em um orbital atômico ou molecular, o que lhes confere alta reatividade (ANGELO; JORGE, 2007). Os radicais livres provenientes da redução do oxigênio são denominados Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), por exemplo o radical hidroxila, o ânion radical superóxido e o peróxido de hidrogênio, enquanto que as Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN) são derivadas do óxido nítrico. Essas

espécies reativas são capazes de reagir com as moléculas celulares e teciduais causando lesões, como a peroxidação de lipídeos, a oxidação de proteínas, a inativação enzimática, danos ao DNA e a ativação excessiva de genes ativos durante a diferenciação e proliferação celular (FERRARI, 1998).

Antioxidantes são substâncias capazes de atrasar ou inibir a oxidação de um substrato por meio da eliminação dos radicais livres (BREWER, 2011) e são classificados em antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos. Os primeiros removem as espécies reativas de oxigênio do meio, bloqueando a iniciação da oxidação e os segundos interagem com os radicais livres, consumindo-os durante a reação (FARIAS, 2004). A interação com os radicais livres ocorre por diversos mecanismos, tais como eliminação de espécies que iniciam a peroxidação, quelação de metais para impedir a geração de espécies reativas, interação com O₂ para a prevenção da formação de peróxidos, interrupção da reação em cadeia auto-oxidativa e redução de concentrações de O₂ localizadas (SHAHIDI; ZHONG, 2015).

O consumo diário de alimentos com antioxidantes produz ação protetora efetiva no organismo contra formas reativas de oxigênio, prevenindo doenças como câncer, aterosclerose, diabetes, artrite, entre outras (HALLIWELL, 2011; RAMARATHNAM; OSAWA, 1994).

Algumas plantas possuem componentes bioativos com ação antioxidante cuja eficácia depende de sua estrutura química, de sua concentração e interação com os outros componentes no alimento, além das condições ambientais (JAAKOLA; HOHTOLA, 2010). Fatores genéticos, grau de maturação e variedade da planta e localização física, também influenciam a eficácia dos compostos bioativos (JAAKOLA; HOHTOLA, 2010; KUMAZAWA; HAMASAKA; NAKAYAMA, 2004). Além disso, a atividade antioxidante das plantas também é afetada pelas características peculiares de cada método de extração (ACQUAVIVA et al., 2013; MICHAEL et al., 2002).

2.5.1 Medida da atividade antioxidante

É importante compreender os ensaios de capacidade antioxidante, seus mecanismos e princípios para fazer a escolha adequada do método a ser utilizado na determinação da atividade antioxidante, de acordo com as características das

amostras. Neste estudo, foram utilizadas duas metodologias para a determinação da atividade antioxidante, a medida da Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio (ORAC) e o ensaio do Poder Antioxidante por Redução Férrica (FRAP).

O princípio do método ORAC consiste na medida do decréscimo da fluorescência das proteínas, moléculas alvos dos radicais livres de oxigênio, ao sofrer dano oxidativo (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). Neste método, a capacidade antioxidante é avaliada a partir da inibição da oxidação induzida por radicais peroxil. A peroxila é utilizada como radical livre por ser a espécie reativa de oxigênio predominante na oxidação lipídica em alimentos e sistemas biológicos. Como fonte desse radical, utiliza-se o 2,2-azobis 2-amidinopropano dihidroclorato (AAPH), que se gera depois de sofrer decomposição térmica (ANTOLOVICH et al., 2002). O possível antioxidante reage com os radicais peroxila, doando átomos de hidrogênio e inibindo a perda da intensidade da fluorescência das proteínas. Essa inibição é proporcional à atividade antioxidante (ANTOLOVICH et al., 2002). Um conjunto de curvas do decréscimo da fluorescência é construído e a área entre presença e ausência do antioxidante é calculada como um indicador da capacidade de eliminação de radicais peroxil. O antioxidante padrão Trolox é utilizado como valor de referência.

O método FRAP determina a capacidade dos antioxidantes em reduzir, em meio ácido, o íon Fe^{3+} (forma férrica) em íon Fe^{2+} (forma ferrosa), presente no complexo 2,4,6 tripiridil-s-triazina (TPTZ). A formação do composto reduzido leva à formação de uma coloração intensa que é medida por meio da absorbância no comprimento de onda de 595 nm (BENZIE; STRAIN, 1996; ANTOLOVICH et al., 2002). Quanto maior a absorbância ou intensidade da coloração, maior será o potencial antioxidante.

2.6 Plantas com atividade biológica

O Brasil destaca-se como o país com a maior diversidade biológica do mundo. Estima-se que o país abrigue de 15 a 20% de toda a biodiversidade mundial, cerca de 55 a 60 mil espécies de plantas (22 a 24% do total mundial) (BRASIL, 2001). Este capital natural é muito importante para a economia nacional pois, conforme cresce o conhecimento sobre a grande biodiversidade brasileira, também cresce a

variedade de espécies utilizadas para uma diversidade de produtos, como por exemplo, alimentos, medicamentos, óleos essenciais, entre outros (BRASIL, 2001).

Nas últimas décadas, o uso de plantas e extratos de plantas na saúde e em setores de alimentação aumentou (PICCIRILLO et al., 2013). As pesquisas de suas propriedades terapêuticas têm crescido devido a vantagens, tais como eficácia, segurança, disponibilidade, aceitabilidade cultural, compatibilidade com o corpo humano e menos efeitos colaterais (KHOMARLOU, et al., 2017; SRINIVAS; REDDY, 2012). A presença de substâncias fitoquímicas nas plantas, tais como alcaloides, glicosídeos, óleos voláteis, taninos, esteroides, saponinas, polifenóis, flavonoides e outros compostos químicos secundários, favorece a ocorrência de atividades antimicrobiana e antioxidante nos seus extratos (GOMMA, 2016; MACIEL et al., 2002).

A eficiência dessas atividades depende de diferentes fatores como temperatura, exposição solar, quantidade de água, nutrientes, período e horário da coleta, método de coleta, idade e parte da planta utilizada, secagem, armazenamento e transporte. Além disso, as características dos solventes utilizados para a extração dos princípios ativos também influenciam essas atividades (BRASIL, 2001; MANZAN et al, 2003; NEGI, 2012; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1999).

Muitas espécies de plantas medicinais podem ser utilizadas como aditivos em alimentos para retardar a oxidação lipídica e conferir segurança (LIU et al., 2012 ; SEMWAL et al., 2015; XU et al., 2015). Dentre essas plantas, incluem-se *Curcuma longa* e *Bixa orellana*.

2.6.1 *Curcuma longa*

A *Curcuma longa* L., também conhecida como açafrão-da-terra, açafrão-da-Índia, tumérico ou gengibre dourado, pertencente à família das *Zingiberaceae*, é uma planta herbácea, perene, com ramificações laterais e de pequeno porte, medindo até 12 cm de comprimento e até 5 cm de diâmetro. É uma espécie amplamente cultivada nas regiões sul e sudoeste da Ásia (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2010; KOCAADAM; SANLIER, 2017; XU et al., 2015).

A parte utilizada da planta é o rizoma, caule parcialmente ou totalmente subterrâneo que, externamente, apresenta uma coloração esbranquiçada ou acinzentada e, internamente, amarelada (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2010). Do rizoma saem as folhas e as hastes florais. Esta planta se reproduz por pedaços do rizoma em solo argiloso, fértil e de fácil drenagem. A colheita deve ocorrer na época em que a planta perde a parte aérea, depois da floração. Nesta fase, os rizomas apresentam pigmentos amarelos intensos (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2010). Apresenta sabor picante, flavor característico e coloração amarelo-laranja. Comercialmente, é utilizada na forma de especiaria, como corante e amido industrial (FRANKLIN et al., 2017; SELVAM et al., 2015).

O rizoma do açafrão-da-terra é composto, em maior quantidade, por amido, proteínas, lipídeos, fibras e, em menor proporção, por pigmentos curcuminoides e óleos essenciais (GUPTA, MAHAJAN; SHARMA, 2015). Os curcuminoides contêm curcumina em maior concentração e desmetoxicurcumina (DMC) e bis-desmetoxicurcumina (BMC) em baixas concentrações. A curcumina é formada por duas estruturas de anel fenólico aromático ligadas por dois grupos carbonila α , β - insaturados, que são responsáveis por efeitos anti-inflamatórios, anticancerígenos, antioxidantes e antimicrobianos (DONG et al., 2015; GUL; BAKHT, 2015; JUNG et al., 2016; KOCAADAM; ŞANLIER, 2017; RAHMAN; ANGAWI; KADI, 2015).

A curcumina é altamente eficiente na neutralização de radicais livres, possuindo cerca de duas vezes a atividade antioxidante do polifenol resveratrol, em uma mesma concentração (AFTAB; VIEIRA, 2010). Os principais componentes do óleo de cúrcuma, responsáveis por essa atividade antioxidante, são α - e β - turmerona, curlone e α -terpineo (AFTAB; VIEIRA, 2010).

O uso de *Curcuma longa* L é indicado para prevenção e tratamento de doenças neurológicas, autoimunes, cardiovasculares e dermatológicas, diabetes, infecções, estresse, depressão e distúrbios metabólicos relacionados à obesidade (KOCAADAM; SANLIER, 2017; MALLMANN et al., 2017; SEPTEMBRE-MALATERRE et al., 2016).

2.6.2 *Bixa orellana*

O urucum (*Bixa orellana*) é uma planta tropical originária da América Central e do Sul (DE ANDRADE et al., 2016), cujo arbusto pode atingir de 2 a 9 m de altura. Os frutos possuem formato de cápsula, com grande número de sementes (JHA; NATH, 2016). É uma cultura que tem como principal produto a semente, cada vez com mais importância econômica, uma vez que de seu pericarpo são extraídos pigmentos (SIVA et al., 2010) amplamente utilizados nas indústrias farmacêuticas, têxteis, de alimentos e bebidas, de tintas e de cosméticos (ANDRADE et al., 2016; BRAGA et al., 2007).

As sementes contêm flavonoides e alcaloides e o principal pigmento encontrado é a bixina, de coloração vermelho-amarelada, que representa cerca de 80% de todos os carotenóides presentes na semente (ALCÁZAR-ALAY et al., 2017). A bixina é solúvel em óleo e é o único carotenoide natural que possui dois grupos carboxílicos, podendo contribuir para a proteção de células e tecidos contra os efeitos deletérios das espécies reativas de oxigênio e radicais livres, além de possuir efeitos anti-inflamatório e antimicrobiano (JHA; NATH, 2016).

2.7 Compostos Fenólicos

Os vegetais possuem dois tipos de metabólitos: primários e secundários. Os metabólitos primários exercem função ativa nos processos de fotossíntese, atuando na respiração e desenvolvimento (NASCIMENTO, 2016; SILVA et al., 2010). Os metabólitos secundários são sintetizados durante a fotossíntese e estão envolvidos na adaptação a condições de estresse ambiental, atuando como mecanismo de defesa contra herbívoros, micro-organismos e plantas concorrentes (NASCIMENTO, 2016; SILVA et al., 2010).

Dentre os metabólitos secundários estão os alcaloides (compostos nitrogenados heterocíclicos), os terpenos (várias unidades de isoprenos), os esteroides e os compostos fenólicos, também chamados de polifenóis (MARTINS; PETROPOULOS; FERREIRA, 2016; NASCIMENTO, 2016; SOARES, 2002).

Os compostos fenólicos possuem uma estrutura básica formada por um anel aromático e uma ou mais hidroxilas, e estão presentes nos vegetais na forma

livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas. Conforme as estruturas químicas, são agrupados nas classes ácidos fenólicos ou não-flavonóides (Subclasses: ácidos hidroxibenzoicos e ácidos hidroxicinâmicos), flavonoides (Subclasses: antocianidinas, flavonas, isoflavonas, flavonóis, flavanonas e flavanóis), taninos e tocoferóis (HOLLMAN; KATAN, 1999; LIU et al., 2015; MERKEN; BEECHER, 2000; NASCIMENTO, 2016).

Esses compostos são biologicamente ativos, capazes de interferir a nível molecular no organismo, inibindo ou reduzindo a ação de radicais livres. Sua presença em plantas tem sido muito estudada por apresentarem atividades farmacológicas e por inibirem a oxidação lipídica (HOLLMAN; KATAN, 1999; RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, 1996).

2.8 Caracterização de compostos químicos de plantas

A técnica de espectrometria de massas permite reconhecer componentes importantes na identificação de metabólitos primários e secundários em plantas. Esta técnica foi utilizada para a caracterização química dos extratos de plantas usados neste trabalho.

Esta metodologia é composta por quatro equipamentos: cromatógrafo líquido de ultra-pressão (UPLC - Ultra Pressure Liquid Chromatography), ionizador por eletrospray (ESI), analisadores de massas quadrupolar e por tempo de voo (TOF). O sistema de UPLC é constituído por quatro componentes principais: uma bomba, um sistema de injeção, uma coluna de separação e um detector (JIN et al., 2008).

Neste sistema, a separação ocorre em duas fases: a fase móvel e a fase estacionária. A fase estacionária é composta por uma coluna com partículas pequenas e porosas ou por um líquido de propriedades específicas, onde, quanto menor for a partícula, mais eficiente é a separação. A fase móvel é composta de líquido, gás ou fluído supercrítico e, juntamente com a amostra a separar, transcorre ao longo da fase estacionária (PORTO, 2014; GUILLARME et al., 2007).

A fase móvel passa pela fase estacionária através dos poros existentes entre as partículas que a compõem, possibilitando a separação dos compostos

através de interações químicas ou físicas, por um processo chamado eluição. Estes compostos são identificados na saída da coluna cromatográfica por um detector, que representa os compostos em forma de gráfico (PORTO, 2014). O tempo que um componente de uma amostra (na fase móvel) demora para atravessar a coluna (fase estacionária) e atingir o detector é denominado tempo de retenção, e pode variar com o fluxo, o comprimento e o diâmetro da coluna (PORTO, 2014).

A tecnologia da UPLC vem sendo melhorada pela utilização de partículas menores na fase estacionária, possibilitando melhor resolução, velocidade, rapidez e, sensibilidade (JIN et al., 2008; WATERS, 2018).

O ESI é utilizado como conexão entre separações por UPLC e identificação dos compostos por espectrometria de massas simples (MS) ou sequencial (MS/MSn) (SAWAYA, 2006). Nesta etapa, moléculas polares, de pequenas até grandes massas e termicamente instáveis são transferidas para a fase gasosa, possibilitando a análise por espectrometria de massas. Na ionização clássica, como a ionização por elétrons (EI), somente é possível a ionização de compostos previamente volatilizados e, geralmente, as moléculas se fragmentam, impossibilitando a identificação de compostos em misturas. Na ESI, a maioria das moléculas é observada sem fragmentação, permitindo a visualização de íons individuais em misturas complexas (SAWAYA, 2006).

Para analisar moléculas com sítios básicos (protonação), o ácido fórmico é adicionado à solução, facilitando a protonação do analito, formando íons $[M + H]^+$ e sua análise é feita em modo positivo. Para moléculas contendo sítios ácidos adiciona-se solução de hidróxido de amônio, o que facilita a perda de um próton da molécula, formando $[M - H]^-$ e a análise é feita em modo negativo (SAWAYA, 2006). Os analisadores de massa quadrupolares são compostos de barras paralelas e cilíndricas de aço inox e têm a finalidade de selecionar o íon, dissociar e analisar os fragmentos produzidos (SAWAYA, 2006). Dentro deles, os íons oscilam de acordo com a voltagem e a rádio frequência aplicadas nas barras e tomam uma determinada trajetória com base na relação massa/carga, até alcançar o detector (SAWAYA, 2006).

No TOF, os íons que passam através do analisador de massas recebem um impulso cinético inicial igual e chegam ao detector em tempos diferentes de acordo

com a relação massa e a carga (m/z). Os íons com menor m/z , possuem maior velocidade e chegam primeiro ao detector. Pela medida do tempo de voo dos íons, pode-se concluir a m/z , podendo analisar compostos de pequenas e grandes moléculas (SAWAYA, 2006).

3 OBJETIVO

O objetivo desse estudo foi identificar os compostos químicos presentes nos extratos de *Curcuma longa* e *Bixa orellana* e neles avaliar a ocorrência de atividade antioxidante e antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* e *Clostridium sporogenes*, visando sua utilização como substitutos de conservantes sintéticos.

REFERÊNCIAS

ACQUAVIVA, R. et al. Antioxidant activity of extracts of *Momordica Foetida* Schumach. et Thonn. **Molecules**, v. 18, n. 3, p. 3241-3249, 2013.

AFTAB, N.; VIEIRA, A. Antioxidant activities of curcumin and combinations of this curcuminoid with other phytochemicals. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 11. 2009, p. 500–502, 2010.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Diretriz nacional para elaboração de programa de gerenciamento do uso de antimicrobianos em serviços de saúde.** 2017. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33852/271855/Diretriz+Nacional+para+Elaborar+a%C3%A7%C3%A3o+de+Programa+de+Gerenciamento+do+Uso+de+Antimicrobianos+em+Servi%C3%A7os+de+Sa%C3%BAde/667979c2-7edc-411b-a7e0-49a6448880d4>>. Acesso em: 10 jan. 2019.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopéia brasileira.** 5. ed. Brasília: ANVISA, Fundação Oswaldo Cruz, 2010. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/index.htm>. Acesso em: 25 out. 2017.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resistência microbiana: mecanismos e impacto clínico.** 2007. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/rm_controlere/opas_web/modulo3/mecanismos.htm>. Acesso em: 5 set. 2017.

ALCÁZAR-ALAY, S. C. et al. Obtaining bixin from semi-defatted annatto seeds by a mechanical method and solvent extraction: Process integration and economic evaluation. **Food Research International**, v. 99, n. 9. 2016, p. 393–402, 2017.

ALVAREZ, C.; LABARCA, J.; SALLES, M. Estratégias de prevenção de *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina (MRSA) na América Latina. **Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 14, n. 2, p. S108-S120, 2010.

ANDRADE, J. I. A. de et al. Efficacy of seed extract of *Bixa orellana* against monogenean gill parasites and physiological aspects of *Colossoma macropomum* after bath treatment. **Aquaculture**, v. 462, p. 40–46, 2016.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, 2007.

ANTOLOVICH, M. et al. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, v.127, n.1, p.183-98, 2002.

AS CORES das carnes condenadas pela OMS. **Revista Exame**, 2015. Disponível em: <<http://exame.abril.com.br/estilo-de-vida/noticias/as-cores-das-carnes-condenadas-pela-oms>>. Acesso em: 20 dez. 2015.

BAGHERYAN, Z. et al. Diazonium-based impedimetric aptasensor for the rapid label-free detection of *Salmonella Typhimurium* in food sample. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 80, p. 566–573, 2016.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": The FRAP assay. **Analytical biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70–76, 1996.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-30, 1999.

BOULIANNE, M. et al. *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of immunology and medical microbiology. **Immunology & medical microbiology**, v. 62, n. 1, p. 1–10, 2011.

BRAGA, F. G. et al. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 396–402, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Doenças transmitidas por alimentos: causa, sintomas, tratamento e prevenção**, 2019a. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/doencas-transmitidas-por-alimentos>. Acesso em: 17 abr. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_integrado_vigilancia_doencas_alimentos.pdf. Acesso em: 18 set. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Proposta de política nacional de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos**. Brasília: MS, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil**. Brasília: MS, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. O Sinan. 2019b. Disponível em: <http://portalsinan.saude.gov.br/>. Acesso em: 27 mar. 2019

BREWER, M. S. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 10, n. 4, p. 221–247, 2011.

BROWN, J. L.; TRAN-DINH, N.; CHAPMAN, B. *Clostridium sporogenes* PA 3679 and its uses in the derivation of thermal processing schedules for low-acid shelf-stable foods and as a research model for proteolytic *Clostridium botulinum*. **Journal of food protection**, v. 75, n. 4, p. 779–792, 2012.

BROWN, K. L. Control of bacterial spores. **British medical bulletin**, Edinburg, v. 56, n. 1, p. 158–171, 2000.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. **International journal of food microbiology**, v. 94, p. 223-253, 2004.

BYRD-BREDBENNER, C. et al. Food safety considerations for innovative nutrition solutions. **Annals of the New York academy of sciences**, v. 1347, n. 1, p. 29–44, 2015.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **CDC report shows progress and gaps in reducing foodborne illnesses**. 2018. Disponível em: <<https://content.govdelivery.com/accounts/USCDC/bulletins/1e3ce30>>. Acesso em: 2 abr. 2018.

CHEN, C.; HUANG, Y. New epidemiology of *Staphylococcus aureus* infection in Asia. **Clinical microbiology and infection**, v. 20, n. 7, p. 605-623, 2014.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **M02-A12**: Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard. 12. ed. Wayne, PA: CLSI; 2015b.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **M07-A10**: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard. 10. ed. Wayne, PA: CLSI; 2015a.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **M11-A8**: Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria: Approved Standard. 8. ed. Wayne, PA: CLSI; 2012.

COHEN, N. L.; OLSON, R. B. Compliance with recommended food safety practices in television cooking shows. **Journal of nutrition education and behavior**, v. 48, n. 10, p. 730–734. ed.1, 2016.

COSTA, D. et al. Mechanisms of antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates recovered from wild animals. **Microbial drug resistance**, v. 14, n. 1, 2008.

DOMENECH, E; MARTORELL, S, Definition and usage of food safety margins for verifying compliance of food safety objectives. **Food control**, v. 59, p. 669-674, 2016.

DONG, J. et al. Curcumolide, a unique sesquiterpenoid with anti-inflammatory properties from *Curcuma wenyujin*. **Bioorganic and medicinal chemistry letters**, v. 25, n. 2, p. 198–202, 2015.

FARIAS, C. de. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecido de ratos. **Revista de nutrição**, v. 17, n. 4, p. 411–424, 2004.

FERRARI, C. K. B. Oxidação lipídica em alimentos e sistemas biológicos: mecanismos gerais e implicações nutricionais e patológicas. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 11, n. 1, p. 3-14, 1998

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATION; WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Food Standards. Codex Alimentarius Commission. Recommended international code of practice general principles of food hygiene. Italy, CAC / RCP 1 – 1969, v. 4, 2003.

FORSYTHE, S. J. *Microbiologia da Segurança dos Alimentos*, 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

FOOD SAFETY NEWS. **CDC names top five foodborne illnesses in United States**. 2018. Disponível em: <<https://www.foodsafetynews.com/2018/01/cdc-names-top-five-foodborne-illnesses-in-united-states/#.Wlj2PainHcc>>. Acesso em: 27 mar. 2019.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos**. São Paulo: Atheneu, p. 182, 1996.

FRANKLIN, M. E. E. et al. Physicochemical, thermal, pasting and microstructural characterization of commercial *Curcuma angustifolia* starch. **Food hydrocolloids**, v. 67, p. 27–36, 2017.

GOMAA, E. G. et al. In vitro screening for antimicrobial activity of some medicinal plant seed extracts. **International journal of biotechnology for wellness industries**, v. 5, p.142-152, 2016.

GÓMEZ, G. C. et al. Ethanolic extract from leaves of *Bixa Orellana L.*: A potential natural food preservative. **Interciência**, v. 37, n. 7, p. 547–551, 2012.

GUIBOURDENCHE, M. et al. Supplement 2003 e 2007 (No . 47) to the white-kauffmann- Le minor scheme. **Research in microbiology**, v. 161, n. 47, p. 26–29, 2010.

GUILLARME, D. et al. Recent developments in liquid chromatography - Impact on qualitative and quantitative performance. **Journal of chromatography**, v. 1149, p. 20–29, 2007.

GUL, P.; BAKHT, J. Antimicrobial activity of turmeric Extract and Its Potential Use in Food Industry. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 4, p. 2272–2279, 2015.

GUPTA, A.; MAHAJAN, S.; SHARMA, R. Evaluation of antimicrobial activity of *Curcuma longa* rhizome extract against *Staphylococcus aureus*. **Biotechnology reports**, v. 6, p. 51–55, 2015.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants – Quo Vadis? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 32, n. 3, p. 125–130, 2011.

HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Dietary flavonoids: Intake, health - effects and bioavailability. *Food chemistry toxicology*, v. 37, n. 10, p. 937-942, 1999.

HOLT, G. J. et al. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9^a ed. Baltimore, USA. 1994. JAAKOLA, L.; HOHTOLA, A. Effect of latitude on flavonoid biosynthesis in plants. **Plant, cell and environment**, v. 33, n. 8, p. 1239–1247, 2010.

JABERIAN, H.; PIRI, K.; NAZARI, J. Phytochemical composition and in vitro antimicrobial and antioxidant activities of some medicinal plants. **Food chemistry**, v. 136, n. 1, p. 237–244, 2013.

JHA, T. B.; NATH, S. EMA Based chromosome analysis in *Bixa orellana L.* and *Limonia acidissima L.* **Nucleus**, v. 59, n. 2, p. 93–98, 2016.

JIN, Y. et al. HPLC and UPLC switch for TCM analysis. **Modernization of traditional chinese medicine and materia medica**. v. 10, n. 1, p. 80–84, 2008.

JOLIVET-GOUGEON, A. et al. Bacterial hypermutation : Clinical implications. p. 563–573, 2011. **Journal of medical microbiology**, v. 60, p. 563–573, 2011.

JUNG, Y. N. et al. Changes in the chemical properties and anti-oxidant activities of curcumin by microwave radiation. **Food science and biotechnology**, v. 25, n. 5, p. 1449–1455, 2016.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature reviews microbiology**. v. 2, n. 2, p. 123-140, 2004.

KAYE, K. S. et al. The Deadly toll of invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in community hospitals. **Clinical infectious diseases**, v. 46, p. 1568-1577, 2008.

KHOMARLOU, N. et al. Evaluation of antibacterial activity against multidrug-resistance (MDR) bacteria and antioxidant effects of the ethanolic extract and fractions of *Chenopodium album* (sub sp striatum). **International journal of pharmaceutical sciences and research**, v. 8, n. 9, p. 3696-3708, 2017.

KLUYTMANS, J. MRSA in food products: Cause for concern or case for complacency? **Clinical microbiology and infection**, v. 16, p. 11–15, 2010.

KOCAAADAM, B. & SANLIER, N. Curcumin, an active component of turmeric (*Curcuma longa*), and its effects on health, **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 57, n. 13, p. 2889-2895, 2015.

KOCAAADAM, B.; ŞANLIER, N. Curcumin, an active component of turmeric (*Curcuma longa*), and its effects on health. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 57, n. 13, p. 2889–2895, 2017.

KUMAR, S.; VARELA, M. F. Molecular mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. In: MÉNDEZ-VILAS, A. (ed.) **Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education**. Badajoz: Formatex, 2013. p. 522-534.

KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, v. 84, n. 3, p. 329–339, 2004.

LANDETE et al. Short communication: Labeling *Listeria* with anaerobic fluorescent protein for food safety studies. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 1, 2017.

LAUDY, A. E.; KULIŃSKA, E.; TYSKI, S. The impact of efflux pump inhibitors on the activity of selected non-antibiotic medicinal products against Gram-negative bacteria. **Molecules**, v. 22, n. 1, p. 1–12, 2017.

LIU, S. et al. Antioxidant activity and phenolic compounds of *holotrichia parallela*

- motschulsky extracts. **Food Chemistry**, v. 134, n. 4, p. 1885–1891, 2012.
- LIU, Y. et al. Role of plant polyphenols in acrylamide formation and elimination. **Food Chemistry**, v.186, n.1, p. 46-53, 2015.
- MACIEL, M. A. M. et al. Medicinal plants: The need for multidisciplinary scientific studies. **Química nova**, v.25, p 429 – 438, 2002.
- MADIGAN, M. T. et al. *Microbiologia de Brock*, Porto Alegre: Artmed, 2010.
- MAINIL, J. *Escherichia coli* virulence factors. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 152, n. 2, p. 2–12, 2013.
- MALLMANN, C. A. et al. *Curcuma longa* L. essential oil composition, antioxidant effect, and effect on *Fusarium verticillioides* and fumonisin production. **Food Control**, v. 73, p. 806–813, 2017.
- MANZAN, A. C. C. M. et al. Extraction of essential oil and pigments from *Curcuma Longa* by steam distillation and extraction with volatile solvents. **Journal of agriculture and food chemistry**, v. 51, n. 23 p. 6802–6807, 2003.
- MARTINS, H. H. DE A. Sinergismo antimicrobiano de óleos essenciais e nitrito sobre *Clostridium sporogenes* inoculado em fiambre de peito de frango. (**Dissertação de mestrado**) Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.
- MARTINS, N; PETROPOULOS, S.; FERREIRA, I. C. F. R. Chemical composition and bioactive compounds of garlic (*Allium sativum* L.) as affected by pre- and post- harvest conditions: A review. **Food Chemistry**, v. 211, p. 41-50, 2016.
- MASALHA, M. et al. Analysis of transcription of the *Staphylococcus aureus* aerobic class Ib and anaerobic class III ribonucleotide reductase genes in response to oxygen. **Journal of bacteriology**, v. 183, n. 24, p. 7260–7272, 2001.
- MERKEN, H. M.; BEECHER, G. R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A Review. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 48, n. 3, p. 577-599, 2000.
- MICHAEL, A. et al. Methods for testing antioxidante activity. **Analyst**, v.127, p. 183-198, 2002.
- NAGARAJ, S. et al. Development and evaluation of a novel combinatorial selective enrichment and multiplex PCR technique for molecular detection of major virulence-Associated genes of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food samples. **Journal of applied microbiology**, v. 116, n. 2, p. 435–446, 2014.
- NASCIMENTO, K. S. do. Compostos fenólicos, capacidade antioxidante e propriedades físico-químicas de méis de *Apis mellifera* do estado do Rio Grande do Sul. (**Dissertação de mestrado**) Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2016.
- NEGI, P. S. Plant extracts for the control of bacterial growth: efficacy, stability and safety issues for food application. **International journal of food microbiology**, v. 156, n. 1, p. 7–17, 2012.

NEWELL, D. G. et al. Food-borne diseases - The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. **International journal of food microbiology**, v. 139, p. S3–S15, 2010.

NIKAIDO H. Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. **Journal of Biological Chemistry**. V. 269, n. 6, p. 3905-3908, 1994.

OMS põe na mira embutidos e carnes por risco de câncer. **Revista Exame**, Ed: Abril, 2015. Disponível em: <<http://exame.abril.com.br/mundo/noticias/oms-poe-na-mira-embutidos-e-carnes-por-risco-de-cancer>>. Acesso em 26 out. 2015.

OTTER, J. A.; FRENCH, G. L. Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. **The lancet Infectious Diseases**, v. 10, n. 4, p. 227–239, 2010.

PICCIRILLO, C. et al. Chemical composition and antibacterial properties of stem and leaf extracts from Ginja Cherry plant. **Industrial crops and products**, v. 43, n. 1, p. 562–569, 2013.

PORTO, H. S. M. HPLC versus UPLC: avaliação de aspetos críticos à transferência e validação de métodos analíticos (**Dissertação**). Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra - Mestrado em Biotecnologia Farmacêutica. Coimbra, 2014.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of agricultural and food chemistry**, Washington, v. 53, p. 4290-4303, 2005.

QUINN, P. J. et al. Microbiologia veterinária essencial, Porto Alegre: Artmed, 2018.

RAHMAN, A. F. M. M.; ANGAWI, R. F.; KADI, A. A. spatial localisation of curcumin and rapid screening of the chemical compositions of turmeric rhizomes (*Curcuma Longa Linn.*) using direct analysis in real time-mass spectrometry (DART-MS). **Food chemistry**, v. 173, p. 489–494, 2015.

RAMARATHNAM, N. et al. The contribution of plant food antioxidants to human health. **Trends in food science & technology**, v. 6, p. 75–82, 1994.

RICE, L. B. Antimicrobial resistance in Gram-positive bacteria. **The american journal of medicine**, v. 119, n. 6. 2002, p. 11–19, 2006.

RICE, L.; BONOMO, R. (2005). Genetic and biochemical mechanisms of bacterial. In: LORIAN, V. (ed.) **Antibiotics in laboratory medicine**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005. p. 441-476.

SANTOS, A. L. dos et al. Staphylococcus aureus : visitando uma cepa de importância Hospitalar. Bras Patol Med Lab p. 413–423, 2007.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free radical biology and medicine**, New York, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

SAWAYA, A. C. F. H. Análise da composição química de própolis brasileira por espectrometria de massas. **(Tese de doutorado)**. Universidade Estadual de Campinas - Instituto de Química - Laboratório Thomson de Espectrometria de Massas. 2006.

SCHMITT, M.; SCHULER-SCHMID, U; LORENZ-SCHMIDT, W. Temperature limits of growth , tnase and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. **International journal of food microbiology**, v. 11, p. 1-20, 1990.

SELVAM, R. M. et al. Extraction of natural dyes from *Curcuma longa*, *Trigonella foenum graecum* and *Nerium oleander*, plants and their application in antimicrobial fabric. **Industrial Crops and Products**, v. 70, p. 84–90, 2015.

SEMWAL, R. B. et al. Gingerols and shogaols: Important nutraceutical principles from ginger. **Phytochemistry**, v. 117, p. 554-568, 2015.

SEPTEMBRE-MALATERRE, A. et al. *Curcuma longa* polyphenols improve insulin-mediated lipid accumulation and attenuate proinflammatory response of 3T3-L1 adipose cells during oxidative stress through regulation of key adipokines and antioxidant enzymes. **BioFactors**, v. 42, n. 4, p. 418–430, 2016.

SHAHIDI, F. ZHONG, Y. Measurement of antioxidant activity. *Journal of functional foods*, v. 18, p. 757-781, 2015.

SHARMA, A.; FLORES-VALLEJO, R. DEL C.; CARDOSO-TAKETA, A.; VILLARREAL, M.L. Antibacterial activities of medicinal plants used in Mexixan Traditional medicine. **Journal of Ethanopharmacology**, v. 208, p. 264-329, 2017.

SHIN, S. W. et al. Prevalence of antimicrobial resistance and transfer of tetracycline resistance genes in *Escherichia Coli* isolated from beef cattle. **Applied and environmental microbiology**, v. 81, n. 16, p. 5560-5566, 2015.

SILVA, M. L. C. et al. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais, **Ciências agrárias**, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

SILVA, N. da et al. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. 3ª ed. Livraria Varela, São Paulo, 2007. SIVA, R. et al. Molecular characterization of bixin an important industrial product. **Industrial Crops and Products**, v. 32, n. 1, p. 48–53, 2010.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71–81, 2002.

SRINIVAS, P.; REDDY, S. R. Screening for antibacterial principle and activity of *Aerva Javanica* (Burmf) Juss. **Asian pacific journal of tropical biomedicine**, v. 2, n. 2, p. S838–S845, 2012.

TANDON, N.; YADAV, S. S. Contributions of Indian Council of Medical Research (ICMR) in the area of Medicinal plants\Tradicional medicine. **Journal of**

Ethnopharmacology, v. 197, p. 39-45, 2017.

TERZOLO, H. R. Estudo bacteriológico das salmoneloses das aves (*S. pullorum*, *S. gallinarum*, *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*) na América Latina. In: Simpósio Internacional sobre Salmonelose Aviária. Rio de Janeiro. 2011. **Anais...**

THWAITES, G. E. et al. Clinical management of *Staphylococcus aureus* Bacteraemia. **Lancet infectious disease**, v. 11, n. 03, p. 208-222, 2011.

TIWARI, B. K. et al. Application of Natural Antimicrobials for Food Preservation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 14, p. 5987–6000, 2009.

TORTORA, G. J., FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

WANG, M. et al. The effect of immunoregulation of *Streptococcus lactis* L16 strain upon *Staphylococcus aureus* infection. **BMC Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 1–6, 2017.

WATERS. UPLC: Ultra performance liquid chromatography. Disponível em: <http://www.waters.com/waters/pt_BR/UPLC---Ultra-Performance-Liquid-Chromatography-Beginner%27s-Guide/nav.htm?cid=134803622&locale=pt_BR>. Acesso em: 1 out. 2018.

WEN, A. et al. Antilisterial activity of selected phenolic acids. **Food microbiology**, v. 20, p. 305–311, 2003.

WHITE, B. P.; BARBER, K. E.; STOVER, K. R. Ceftaroline for the Treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. **American journal of health-system pharmacy**, v. 74, n. 4, p. 201–208, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Monographs on selected medicinal plants**. Geneva: WHO, 1999. v. 1. Disponível em: <<http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/s2200e/s2200e.pdf>>. Acesso em: 22 jul. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Who global strategy for food safety: safer food for better health**. Geneva: WHO, 2002. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42559/9241545747.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 26 jun. 2018.

XU, J. et al. Absolute configurations and NO inhibitory activities of terpenoids from *Curcuma longa*. **Journal of agricultural and food Chemistry**, v. 63, n. 24, p. 5805-5812, 2015.

ZELENY, R. et al. Development of a reference material for *Staphylococcus aureus* enterotoxin A in cheese: feasibility study, processing, homogeneity and stability assessment. **Food Chemistry**, v. 168, p. 241–246, 2015.

CAPÍTULO 2 - ARTIGO CIENTÍFICO - CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATOS ETANÓLICOS DE *Curcuma longa* E *Bixa orellana* PERIÓDICO: MOLECULES

RESUMO

O objetivo deste estudo foi investigar a composição química e as atividades antimicrobiana e antioxidante dos extratos etanólicos de *Curcuma longa* e *Bixa orellana*, na busca por substituintes aos aditivos sintéticos utilizados como conservadores na indústria de alimentos. Pela espectrometria de massa (GC-MS), foram identificados bisdemetoxicurcumina, demetoxicurcumina e curcumina no extrato de *C. longa* e prunina e naringenina no extrato de *B. orellana*. *C. longa* apresentou atividade antimicrobiana frente a *Clostridium sporogenes* e *Staphylococcus aureus*, com concentração bactericida mínima (CBM) de 25 mg/mL e 156 µg/mL, respectivamente. O extrato de *B. orellana* apresentou CBM de 50 mg/mL para *C. sporogenes* e 625 µg/mL para *S. aureus*. Nenhum dos extratos apresentou atividade bactericida para *Escherichia coli* e *Salmonella* Typhimurium. A atividade antioxidante dos extratos foi evidenciada pelos métodos Poder Antioxidante por Redução Férrica (FRAP) e Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio (ORAC). O extrato de *B. orellana* apresentou maior atividade antioxidante pelos métodos FRAP e ORAC (277,70 e 455,17 mM trolox equivalente/g, respectivamente) do que o extrato de *C. longa* (129,74 e 217,98 mM trolox equivalente/g, respectivamente). Os efeitos biológicos dos extratos etanólicos de *C. longa* e *B. orellana* revelados no presente estudo apontaram seu potencial para a utilização na indústria de alimentos como uma alternativa aos aditivos sintéticos.

Palavras-chave: antibacterianos, antioxidantes, aditivos alimentares, bactérias anaeróbias, bactérias aeróbias, bactérias Gram-negativas, bactérias Gram-positivas, espectrometria de massas, curcumina, flavononas.

CHEMICAL CHARACTERIZATION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF *Curcuma longa* and *Bixa orellana* ETHANOLIC EXTRACTS

ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the chemical composition and the antimicrobial and antioxidant activities of *Curcuma longa* and *Bixa orellana* ethanolic extracts, in the search for alternatives to the synthetic additives used in the food industry. Mass spectrometry (GC-MS), identified bisdemethoxycurcumin, demethoxycurcumin and curcumin in the extract of *C. longa* and prunin and naringenin in the extract of *B. orellana*. *C. longa* showed antimicrobial activity against *Clostridium sporogenes* and *Staphylococcus aureus*, with a minimum bactericidal concentration (MBC) of 25 mg/mL and 156 µg/mL, respectively. MBC of *B. orellana* extract was 50 mg/mL for *C. sporogenes* and 625 µg/mL for *S. aureus*. None of the extracts showed bactericidal activity against *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium*. The antioxidant activity of the extracts was evidenced by the methods Iron Reduction Antioxidant Power (FRAP) and Oxygen Radical Absorption Capacity (ORAC). *B. orellana* extract had higher antioxidant activity by FRAP and ORAC (277.70 and 455.17 mM trolox equivalent/g, respectively) than *C. longa* extract (129.74 and 217.98 mM trolox equivalent/g, respectively). The biological effects of *C. longa* and *B. orellana* ethanolic extracts revealed in this study indicated their potential as an alternative to synthetic additives used in the food industry.

Keywords: antibacterials, antioxidants, food additives, anaerobic bacteria, aerobic bacteria, Gram-negative bacteria, Gram-positive bacteria, mass spectrometry, curcumin, flavonones.

1 INTRODUÇÃO

Apesar dos avanços significativos na ciência e tecnologia dos alimentos e no conhecimento do consumidor em relação à manipulação dos alimentos, as doenças de origem alimentar continuam crescendo, trazendo sequelas nocivas para a saúde e para a economia dos países desenvolvidos e em desenvolvimento [1]. A Organização Mundial da Saúde (OMS) ressalta o fato de que a falta de segurança dos alimentos está ligada à morte de cerca de dois milhões de pessoas anualmente [2].

No Brasil, a incidência da maioria das doenças transmitidas por alimentos (DTA) permaneceu inalterada ou aumentou na última década. Em 2018, foram notificados aproximadamente 500 surtos de DTA [3]. Nos Estados Unidos, 48 milhões de casos são relatados por ano, resultando em 3000 mortes [4].

Alguns micro-organismos estão diretamente relacionados às DTA, como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Clostridium* spp. [5]. Essas bactérias prejudicam seriamente a saúde humana, sendo necessário seu controle no alimento [6]. No Brasil, no período de 2007 a 2018, a maioria dos agentes etiológicos de DTA foram *E. coli* (n = 525), *Salmonella* (n = 515), *S. aureus* (n = 407) e *Clostridium* spp. (n = 119), representando 95,9% das notificações [3] e variantes dessas bactérias vêm desenvolvendo resistência a agentes antimicrobianos importantes [7].

A conscientização dos consumidores para o risco dos aditivos alimentares sintéticos cresce constantemente [8], resultando na necessidade da indústria de alimentos em buscar aditivos naturais que possam substituí-los. A OMS já relatou o risco do consumo excessivo de carnes processadas com adição de nitrito, advertindo sobre o potencial cancerígeno desse aditivo [9], e a necessidade de substituição dos conservantes sintéticos na fabricação de alimentos.

O avanço das ciências fitoquímicas e fitofarmacológicas permite a descoberta da composição de vegetais com propriedades antimicrobianas e antioxidantes, que podem encontrar uso industrial [10]. Os fitoterápicos têm sido utilizados para o tratamento de doenças e como suplemento alimentar, devido à presença de fitonutrientes como vitaminas, minerais e compostos bioativos [11,12].

Produtos naturais como açafrão e urucum possuem a capacidade de melhorar a estabilidade oxidativa de produtos alimentícios e aumentar sua vida útil, por apresentarem características antioxidantes [13,14]. A oxidação lipídica é uma das principais causas de deterioração química dos alimentos, pois provoca danos nas proteínas, no DNA e nos lipídios, resultando em perda da qualidade nutricional, alterações nos atributos sensoriais (cor, sabor e odor de ranço) e, ocasionalmente, levando à produção de compostos tóxicos [15].

Visando buscar alternativas para a substituição dos aditivos sintéticos na indústria de alimentos, este estudo, avaliou, “*in vitro*”, as atividades antimicrobiana e antioxidante dos extratos do rizoma de *Curcuma longa* (açafrão) e do fruto da *Bixa orellana* (urucum).

2 RESULTADOS

2.1 Composição química dos extratos de *Curcuma longa* e *Bixa orellana*

A análise qualitativa da composição química dos extratos de *C. longa* e *B. orellana* revelou a presença de vários compostos bioativos. No extrato de *C. longa*, bisdemetoxicurcumina, demetoxicurcumina e curcumina foram os componentes dominantes, além de aminoácidos (Figura 1). No extrato da *B. orellana*, os principais compostos identificados foram prunina e naringenina (Figura 2)

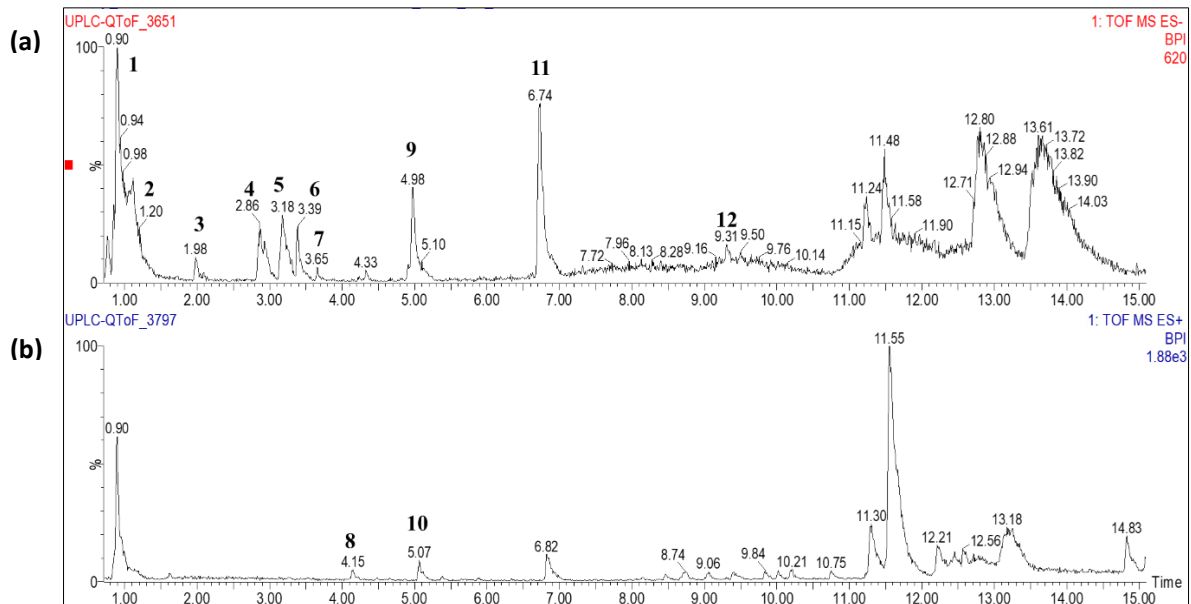


Figura 1. Cromatograma do extrato etanólico bruto do rizoma da *Curcuma longa* nos modos negativo (a) e positivo (b) de ionização.

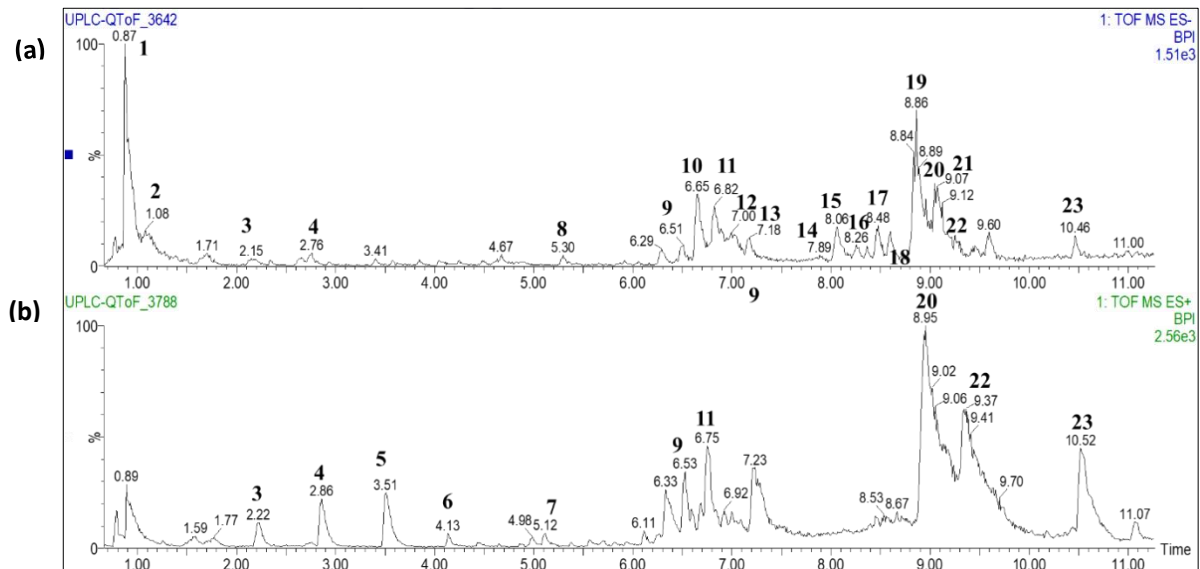


Figura 2. Cromatograma do extrato etanólico bruto do fruto da *Bixa orellana* nos modos negativo (a) e positivo (b) de ionização.

Com base na literatura [16], os picos 1 e 2 no cromatograma negativo (Fig. 1a) foram identificados como sacarose, cuja presença foi confirmada no modo de ionização positivo (Fig. 1b), pelas fragmentações características. O pico 3, no modo de ionização negativo (Fig. 1a), identificou o aminoácido fenilalanina e o pico 4, nos modos de ionização positivo e negativo (Fig. 1a e 1b), identificou o aminoácido triptofano, conforme relatado por Wrona (2016) [17].

Os picos 11, 12, 13, 14, 19, 20, 21 e 22 no modo de ionização negativo (Fig. 1a), identificados com base no estudo de Herebian et al. (2009) [18], são característicos dos compostos da classe dos curcuminóides, dentre eles a bisdemetoxicurcumina (picos 11, 19 e 20), a curcumina (picos 13, 14 e 22) e a demetoxicurcumina (picos 12 e 21). Os picos 11, 20 e 22 foram confirmados no modo de ionização positivo (Fig. 1b), exibindo fragmentos característicos para a bisdemetoxicurcumina (pico 20) e para a curcumina (picos 11 e 22). Os picos 5-10, 15-18 e 23 são referentes a substâncias cujas fórmulas moleculares não possuem relatos na literatura (Fig. 1a e 1b).

O pico 9 da Fig. 2a no modo de ionização negativo foi identificado como prunina, conforme já relatado na literatura por Li et al. (2016) [19]. O pico 10 no modo de ionização positivo (Fig. 2b) e o pico 11 no modo de ionização negativo (Fig. 2a)

foram identificados como naringenina, também relatados anteriormente por Li et al. (2016) [19]. Os picos 1 e 2 no cromatograma negativo (Fig. 2a), de acordo com Farag et al. (2014), indicam a presença de sacarose [16]. Os picos 3-7, 8 e 12 não foram identificados após intensa busca na literatura (Fig 2a e 2b).

2.2 Atividade antimicrobiana dos extratos de *Curcuma longa* e *Bixa orellana*

A atividade antimicrobiana dos extratos foi avaliada frente a micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos, aeróbios e anaeróbios. Não houve atividade bactericida das diluições dos extratos das plantas testadas para as bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Salmonella Typhymurium*). Para *Staphylococcus aureus* MRSA, a concentração bactericida mínima (CBM) foi de 156 µg/mL quando utilizada *C. longa* e de 625 µg/mL quando a bactéria foi exposta à *B. orellana*. Para *Clostridium sporogenes*, a CBM foi de 25 mg/mL para *C. longa* e de 50 mg/mL para *B. orellana*. O controle negativo realizado com etanol não mostrou efeito inibidor sobre as bactérias testadas e os controles positivos permitiram o crescimento de todas elas.

2.3 Atividade antioxidante dos extratos de *Curcuma longa* e *Bixa orellana*

O perfil de atividade antioxidante foi analisado nas concentrações capazes de inibir o crescimento de *C. sporogenes*, e está apresentado na Tabela 1.

Em ambas as técnicas testadas (FRAP e ORAC), o extrato de *B. orellana* 5% apresentou atividade antioxidante superior à do extrato de *C. longa* 2,5%. Comparando-se os métodos, o ORAC apresentou resultados superiores ao FRAP para os dois extratos. Os valores do coeficiente de variação foram considerados satisfatórios.

Tabela 1. Atividade antioxidante* dos extratos etanólicos brutos de *Curcuma longa* e *Bixa orellana*.

Métodos	Extratos			
	<i>Curcuma longa</i> (2.5%)		<i>Bixa orellana</i> (5%)	
	$\bar{X} \pm S$	CV	$\bar{X} \pm S$	CV
FRAP	129,738 \pm 1,07	0,8265	277,699 \pm 3,63	1,3079
ORAC	217,976 \pm 4,34	1,9917	455,167 \pm 47,39	10,4123

*mM trolox equivalente; $\bar{X} \pm S$ = média \pm desvio padrão; CV = coeficiente de variação.

FRAP = Poder antioxidante por redução férrica

ORAC = Capacidade de absorção do radical oxigênio

3 DISCUSSÃO

3.1 Composição química dos extratos de *Curcuma longa* e *Bixa orellana*

C. longa apresentou como compostos fenólicos dominantes os curcuminoides, incluindo a curcumina e seus derivados, desmetoxicurcumina e bisdemetoxicurcumina [20]. Os curcuminoides são importantes compostos bioativos com potencial medicinal, que podem ser muito úteis na indústria alimentícia [21,22].

Kim et al. (2005) analisaram o perfil químico da *C. longa* originária da Korea e também encontraram os flavonoides como dominantes, além de glicosídeos e esteroides [23]. Em outro estudo [24], a composição e a bioatividade de rizomas de *C. longa* coletados de 20 habitats diferentes foram analisadas, e os principais compostos encontrados foram ar-turmerona (0,92-42,85%), β -turmerona (5,13-42,54%), α -zingibereno (0,25-25,05%), ar-curcumeno (1,21-15,70%) e β -sesquifelandreno (0,05-14,88%) [24]. Esses resultados demonstram que a composição química dos rizomas de *C. longa* cultivados em diferentes locais varia, proporcionando distintas atividades biológicas. A diferença na composição está relacionada a fatores que afetam diretamente a qualidade e a quantidade de metabólitos secundários presentes no extrato final, tais como condições climáticas e sazonais, precipitação, concentração de nutrientes do solo ou tempo de coleta, entre outros [25].

Ao pesquisar diferentes solventes para a preparação de extratos de *C. longa*, Gupta et al. (2015) obtiveram como compostos dominantes alcaloides, taninos, flavonoides, glicosídeos e carboidratos [26]. Em nosso estudo, a extração com etanol permitiu a identificação de flavonoides, carboidratos e aminoácidos. Essas diferenças podem ser justificadas pelo perfil fitoquímico das plantas e pelos extratores serem diferentes em cada experimento [25].

Neste estudo, mostramos algumas diferenças qualitativas com outros relatórios de análise de GC-MS da *C. longa* [23,24,26]. Porém, todos os trabalhos citados identificaram compostos com capacidade de prospecção biotecnológica, evidenciando a importância do rizoma de *C. longa* como fonte de bioatividade.

B. orellana apresentou como compostos dominantes a prunina e a naringenina. A naringenina é um flavonoide que ocorre na forma de glicosídeo, apresentando um amplo espectro de atividades biológicas, incluindo antibacteriana, antifúngica, antioxidante e anticancerígena [27]. Também foram observados derivados da naringenina em extratos vegetais da família *Asteraceae*, plantas com propriedades medicinais [28].

Os compostos fenólicos representam os principais constituintes químicos de diferentes partes da *B. Orellana* [14]. Esses compostos exercem efeitos tóxicos em nível de membrana celular, com intensidade variável, dependendo de sua hidrofobicidade [29]. O fenol exerce seu efeito tóxico por influenciar as relações proteína-lipídeo e induzir o efluxo de íons de potássio, além de também poder provocar a lise da parede celular bacteriana [30,31].

3.2 Atividade antimicrobiana dos extratos de *Curcuma longa* e *Bixa orellana*

O extrato do rizoma da *C. longa* apresentou atividade antimicrobiana frente às bactérias Gram-positivas *S. aureus* (aeróbia) e *C. sporogenes* (anaeróbia), mas não frente às bactérias Gram-negativas avaliadas. A complexidade da membrana externa das bactérias Gram-negativas pode dificultar a penetração de substâncias com ação antimicrobiana nas células, sua forte carga negativa também é um fator importante na evasão de fagocitose e na lise celular [32,33]. Além disso, esse grupo de bactérias concentra uma série de enzimas no espaço periplasmático da parede celular, que podem inativar compostos antimicrobianos. Resultados similares aos observados neste experimento foram relatados para os mais diversos extratos e óleos essenciais de plantas [32,34,35]. Gul et al. (2004) analisaram a atividade antimicrobiana da *C. longa* contra *S. aureus* e *E. coli* e o resultado foi semelhante ao constatado neste estudo [36]. A atividade antimicrobiana do extrato de *C. longa* contra *S. aureus* (156 µg/mL) e *C. sporogenes* (25 mg/mL) foi atribuída à presença dos curcuminoides identificados na CG-MS [37]. *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) foi utilizado para a avaliação da propriedade antimicrobiana dos extratos das plantas por apresentar perfil de resistência à maioria dos antimicrobianos existentes no

mercado, o que demanda a busca por compostos alternativos com propriedades conservantes para manter a segurança dos alimentos [38].

Várias partes da planta de *C. longa* possuem atividade antimicrobiana, porém o rizoma é a que apresenta melhor atividade [26], o que justifica nossa escolha para este estudo. Suas bioatividades são principalmente anti-inflamatórias, antioxidantes, antimicrobianas, anticancerígenas e antivirais [39]. Entretanto, o mecanismo de ação específico para a atividade antimicrobiana de plantas com propriedade microbicida ainda não está bem definido, mas vários alvos na célula microbiana podem contribuir para a sua eficácia [40], tais como, degradação da parede celular, danos à membrana citoplasmática e às proteínas da membrana, extravasamento do conteúdo celular, coagulação do citoplasma e esgotamento da força motriz [40–42].

Lee et al. (2014) avaliaram a atividade antibacteriana do extrato aquoso de raízes da Cúrcuma doméstica *Valeton* contra *Clostridium perfringens* e encontraram concentração mínima inibitória de 183 µg/mL, evidenciando o potencial antimicrobiano das plantas da família da *Zinberaceae* [43]. Gul e Bakht (2015), rastrearam a atividade antimicrobiana de vários extratos de *C. longa* contra bactérias comuns em alimentos, como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* Thyphymurium e *Candida albicans* usando o método de difusão de disco e todos os extratos (água, n-hexano, metanol e clorofórmio) mostraram propriedades antibacterianas e antifúngicas significativas [37]. Esses dados demonstram que a natureza antimicrobiana do fitoquímico é determinada por suas propriedades químicas, como a solubilidade [44] e a polaridade que, por sua vez, são influenciadas pelo extrator [38,45].

A atividade antimicrobiana do extrato de *B. orellana* para *S. aureus* (CMB 625 µg/mL) e para *C. sporogenes* (CMB 50 mg/mL) pode ser atribuída aos componentes dominantes identificados por CG-MS, prunina e naringenina. Alguns estudos demonstraram que a naringenina aumenta a permeabilidade da membrana celular e inibe a motilidade bacteriana, exercendo um efeito antimicrobiano [28,46]. No entanto, não se verificou atividade antimicrobiana do extrato de *B. orellana* contra *E. coli* e *Salmonella* Typhimurium. Owen e Palombo (2007) atribuíram a ineficiência de *B. orellana* contra bactérias Gram negativa à alta proporção de lipídeos que contêm

em sua membrana celular externa, o que ficou demonstrado em nosso experimento pela presença de lipídeos no extrato da planta [47].

No entanto, a eficiência da atividade antibacteriana do extrato etanólico da folha da *B. orellana* foi observada para outros gêneros bacterianos como *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella sonnei*, *Listeria monocytogenes*, com concentrações inibitórias mínimas (CIM) variando de 256 µg/mL até 1024 µg/mL [48]. Muthukumar et al. (2014) conduziram um estudo com microesferas de colágeno preparadas com extrato de folha de *B. orellana* na concentração de 1 mg/mL e observaram propriedade antimicrobiana contra *S. aureus* e *E. coli* pelo método de difusão em disco [49]. Isso evidencia que a atividade antimicrobiana é dependente da concentração do extrato vegetal, efeito que pode ser reforçado aumentando-se a dose do extrato [50]. Tamil et al. (2011) testaram a atividade inibitória do extrato metanólico da folha e da semente de *B. orellana* contra cepas bacterianas e fúngicas e observaram que o extrato da folha foi mais efetivo contra os micro-organismos testados. Os autores atribuíram os achados à capacidade dos compostos fenólicos presentes no extrato foliar em se complexar com proteínas e paredes celulares bacterianas. Os resultados obtidos em nosso estudo se diferenciam dos observados por Tamil et al. (2011) pelo fato de que procedem de partes diferentes da planta, onde existem distintos compostos bioativos [51]. A falta de reprodutibilidade da atividade antimicrobiana de plantas é um dos principais obstáculos para seu uso industrial, uma vez que variações qualitativas e quantitativas no conteúdo de bioativos dos fitoquímicos resultam em eficácia variável [41].

A ação do composto antimicrobiano é dependente de gênero, espécie e linhagem do micro-organismo alvo, e de fatores ambientais como pH, atividade de água, temperatura, composição atmosférica e carga microbiana do substrato alimentar [41]. Neste trabalho, foi utilizada a metodologia da diluição em caldo preconizada pelo CLSI (2015). Gomez et al. (2012) destacam que esta metodologia se sobressai em estudos como esse devido à total exposição das bactérias aos compostos com possível atividade antimicrobiana, diferentemente de quando se utilizam metodologias como a difusão em disco, onde a difusão dos extratos através do ágar é limitada [48,52].

3.3 Atividade antioxidante dos extratos de *Curcuma longa* e *Bixa orellana*

Os compostos fenólicos apresentam atividade antioxidante atuando na neutralização de radicais livres e contribuindo para o controle do estresse oxidativo [53,54]. Os resultados encontrados com o método ORAC mostraram que o extrato etanólico de *C. longa* apresenta forte atividade antioxidante (217, 97 mM TE/g), sugerindo altas quantidades de fenóis. Alguns fatores como a localização, a sazonalidade e a estação de coleta podem influenciar a concentração de compostos bioativos nas plantas e a biossíntese de metabólitos secundários (flavonóides), influenciando seu potencial antioxidante e seus efeitos biológicos [53,54].

A maior atividade antioxidante observada no extrato de *B. orellana* em comparação ao extrato de *C. longa* pode ser devida à presença dos aminoácidos fenilalanina e triptofano na *C. longa*, uma vez que a presença desses componentes pode interferir na quantificação desse parâmetro nos alimentos [55].

Tilak et al. (2004) estudaram a capacidade antioxidante dos extratos do rizoma de açafrão processado e cru pelos métodos FRAP e ORAC com diferentes solventes (água/etanol) e encontraram diferenças entre os métodos e entre os solventes utilizados. Os autores encontraram que o ORAC mostrou maior afinidade pelo etanol, apresentando maior atividade antioxidante (25 $\mu\text{mol TE/g}$) em relação ao extrato aquoso (10,27 $\mu\text{mol TE/g}$). No ensaio FRAP houve efeito dependente da concentração do extrato (concentrações testadas: 0,1 mM; 0,5 mM; 1 mM) [56]. Divergências entre os métodos podem ocorrer devido a características peculiares de cada um, tais como, pH, temperatura e tipo de radical, bem como devido à interação dos solventes utilizados, à estrutura química e à polaridade do solvente [57].

Hung-Der et al. (2007) avaliaram a capacidade antioxidante do extrato de *C. longa* obtido em água quente, metanol e acetona pelo método FRAP e encontraram uma atividade de 11 $\mu\text{mol/L}$ [58]. Esses resultados diferem dos encontrados em nosso estudo, provavelmente devido a diferenças no processo de extração, tais como o tipo e a quantidade de solventes utilizados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Plantas

O rizoma de *Curcuma longa* (açafrão) e o fruto de *Bixa orellana* (urucum) foram coletados, secos em estufa por 72 h a 40 +/- 1 °C e triturados. As folhas, ramos, frutos e flores foram autenticados botanicamente no Departamento de Botânica - IB - UNESP - Botucatu.

4.2 Produção do extrato etanólico

Inicialmente, 1% da planta desidratada e 99% de etanol a 99% v/v foram misturados e homogeneizados durante 48 h, em temperatura ambiente (27 +/- 3 °C). Após esta etapa, foi realizada a filtração e o conteúdo foi concentrado em evaporador rotativo a 50 °C, obtendo-se os extratos.

4.3 Caracterização química dos extratos

As análises químicas dos extratos foram realizadas em um sistema Acquity UPLC (Waters), acoplado a um sistema de Quadrupolo/TOF (Waters) contendo uma coluna Waters Acquity UPLC BEH com a temperatura fixada em 40 °C. As fases móveis foram água com 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (B), com gradiente variando 0-15 min (2-95%) de B; 15,1-17 min (100%) de B; 17,1-19,1 min (2%) de B, fluxo de 0,4 mL/min e volume de injeção da amostra de 5 µL. O espectrômetro de massas foi operado nos modos negativo e positivo de ionização (ESI). O instrumento foi controlado pelo software Masslynx 4.1 (Waters Corporation).

4.4 Determinação da atividade antimicrobiana para micro-organismos aeróbios

Cepas de referência de *Staphylococcus aureus* (MRSA) (ATCC 33591), *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028) e *Escherichia coli* (ATCC 35218) foram reativadas por plaqueamento em superfície em Ágar triptona de soja e cultivadas em Caldo-infusão de cérebro e coração. Para a obtenção das suspensões bacterianas foi utilizada solução salina e os inóculos foram padronizados em 10^8 UFC/mL, verificando-se a densidade ótica a 600 nm.

A concentração mínima bactericida (CMB) dos extratos, ou seja, a menor concentração dos extratos capaz de causar a morte do inóculo, foi determinada pela técnica de diluição seriada em microplaca, de acordo com o CLSI [59]. Os extratos foram diluídos em etanol na concentração de 2,5% (solução estoque). Em placas de microtitulação de 96 poços foram distribuídos 200 μ L de caldo Mueller Hinton e, em seguida, 200 μ L da solução estoque dos extratos foram acrescidos ao primeiro poço e, após homogeneização, foram transferidos para o segundo e assim sucessivamente, obtendo-se oito diluições. As suspensões bacterianas (100 μ L) foram preparadas em caldo Mueller Hinton (9,9 mL) e 10 μ L delas foram inoculados nos poços da microplaca contendo as diluições dos extratos. As microplacas foram incubadas a 37 °C +/- 1 °C por 24 h, em condições de aerobiose.

Foram preparados controles positivos com 200 μ L de caldo Mueller Hinton e 10 μ L de cada solução salina inoculada, controles negativos somente com o meio Mueller Hinton e controle do extrator com 200 μ L do meio Mueller Hinton, 200 μ L do extrator (álcool etílico absoluto) e 10 μ L de cada solução salina inoculada.

Com a utilização de um replicador, alíquotas dos poços da microplaca foram transferidas para a superfície de placas contendo ágar Mueller Hinton e incubadas por 24 horas a 37 °C +/- 1 °C. Os ensaios foram realizados em triplicata e três repetições.

4.5 Determinação da atividade antimicrobiana para micro-organismos anaeróbios

Ao contrário de *Clostridium botulinum*, o *Clostridium sporogenes* não é patogênico, estando comumente relacionado com a deterioração dos alimentos [60].

Devido à sua semelhança genética e fisiológica com as espécies de *Clostridium botulinum* Grupo I (proteolítica), *C. sporogenes* é frequentemente utilizado como substituto para aquele micro-organismo em ensaios laboratoriais [61], o que ocorreu neste estudo.

A cultura liofilizada do *Clostridium sporogenes* (ATCC 3584) foi reativada em *Differential Reinforced Clostridium Base Broth* (DRCBB) suplementado com 0,5% de solução de sulfato de sódio (4%) e citrato férrico (7%), com incubação em anaerobiose a 37 °C +/- 1 °C por 48 horas. Posteriormente, a cultura foi centrifugada a 860 g por 5 minutos, o sobrenadante foi desprezado e o meio de congelamento (glicerol 30 mL; peptona bacteriológica 0,5 g; extrato de levedura 0,3 g; NaCl 0,5 g; água destilada 100 mL) foi adicionado ao *pellet*, constituindo-se nas culturas estoque, que foram mantidas congeladas durante o período de execução do experimento.

Para a reativação das culturas estoques foi utilizado o meio DRCBB suplementado com 0,5% de solução de sulfato de sódio e citrato férrico, com incubação a 37 °C +/- 1 °C por 48 horas. A padronização do inóculo em 10⁵ UFC/g foi realizada pela determinação da densidade ótica a 600 nm em meio DRCBB acompanhada pela contagem em placas utilizando-se ágar Base de Isolamento de *Clostridium* (40 g de caseína; 5 g de extrato de levedura; 2 g de dextrose; 0,02 g de púrpura de bromocresol; 5 g de fosfato de sódio 2,2 g de cloreto de sódio; 0,01 g de sulfato de magnésio; 20 g de ágar). As placas foram incubadas a 37 °C +/- 1 °C por 48 horas em anaerobiose.

A determinação da CMB foi realizada empregando-se a técnica de diluição em caldo de acordo com o CLSI [59] com modificações. A diluição dos extratos foi realizada em *Caldo reinforced Clostridium base* acrescido de 0,5% (v/v) de Tween 80[®]. Os extratos foram avaliados nas concentrações de 2,5; 5,0; 7,5; e 10,0%, em triplicata e três repetições. Alíquotas de 5 µL de cultura padronizada foram transferidas para tubos de rosca contendo 5 mL do caldo, acrescidos dos extratos.

Foram preparados tubos controles positivos com *Caldo reinforced clostridium base* acrescido de 0,5% (v/v) de Tween 80[®] e negativos, apenas com o meio de cultura. Após a homogeneização, os tubos foram incubados a 37 °C +/- 1 °C por 24 horas em condições anaeróbias, geradas pela adição de óleo mineral estéril. Alíquotas de 1 mL do meio foram transferidas para placas de Petri e adicionadas de

Agar Base Clostridium, empregando-se sobrecamada, e incubadas a 37 °C +/- 1 °C por 48 horas em anaerobiose. Considerou-se CMB dos extratos aquelas onde não foi observado o crescimento em placas.

4.6 Determinação da atividade antioxidante

4.6.1 Capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC)

A determinação da atividade antioxidante total por ORAC foi realizada empregando-se a metodologia da AOAC [62], pelo método hidrofílico. Nesse ensaio, 25 µL de amostra foram misturados a 150 µL de uma solução de fluoresceína diluída em tampão fosfato (pH 7,4) em microplacas pretas e incubados à temperatura constante de 37 °C por 15 min. Os reagentes foram preparados em tampão fosfato 75 mM, pH 7,4. Posteriormente, foram adicionados 25 µL da solução de 2,2-azobis 2-amidinopropano dihidroclorato (AAPH), que dá início à reação. A intensidade da fluorescência (485 nm excitação / 520 nm emissão) foi verificada a cada 10 minutos durante 80 minutos. O cálculo da perda da fluorescência, ou área sob a curva (ASC), foi efetuado com o auxílio da seguinte fórmula:

$$ASC = 1 + f_1 / f_0 + \dots\dots\dots f_i / f_0 + \dots\dots\dots + f_{80} / f_0$$

onde f_0 representa fluorescência obtida no tempo 0 e f_i a fluorescência obtida entre 0 e 80 minutos. A área da perda de fluorescência de uma amostra foi calculada subtraindo-se a área correspondente à do controle. A determinação de fluorescência foi realizada utilizando espectrofotômetro de fluorescência. Todas as análises foram realizadas em triplicata com três repetições e os valores foram expressos em mM TE (trolox equivalente)/g de amostra, em base seca.

4.6.2 Poder antioxidante por redução férrica (FRAP)

A capacidade de redução férrica dos extratos foi determinada pelo método FRAP (Benzie & Strain, 1996) [63] com modificações. O reagente FRAP foi preparado ao abrigo da luz com tampão acetato de 300 mM/L (pH 3,6), 10 mM de TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina) em uma solução de 40 mM/L de HCl e 20 mM/L de FeCl₃. As amostras e as soluções padrões foram misturadas com água deionizada e o reagente

FRAP, e foram colocados em banho-maria durante 30 min, a 37 °C. Após o resfriamento à temperatura ambiente, as absorbâncias das amostras e da solução padrão foram lidas a 595 nm. A curva padrão de trolox foi preparada usando concentrações de 10 a 800 µMTE/L. Os resultados foram expressos em mMTE/g.

4.7 Análise estatística

Os resultados quantitativos das análises de poder antioxidante foram expressos na forma de média ± desvio padrão (SD) das três repetições de cada experimento. Microsoft Office Excel 2017 foi usado para processar os dados.

5 CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo mostraram que os extratos de *C. longa* e *B. orellana* possuem atividade antimicrobiana e antioxidante. Sugere-se a possibilidade de uso mais amplo desses compostos na indústria de alimentos.

REFERÊNCIAS

1. Byrd-Bredbenner, C.; Cohn, M. N.; Farber, J. M.; Harris, L. J.; Roberts, T.; Salin, V.; Singh, M.; Jaferi, A.; Sperber, W. H. Food safety considerations for innovative nutrition solutions. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2015, 1347, 29–44, doi:10.1111/nyas.12779.
2. Day, W. H. **World Health Day** 2015 HOW SAFE CampaiGn tool kit. 2015.
3. Brasil Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. **Ministério da Saúde**. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. *Sus - Ms* 2018, 17.
4. Cohen, N. L.; Olson, R. B. Compliance With Recommended Food Safety Practices in Television Cooking Shows. *Journal of Nutrition Education and Behavior* 2016, 48, 730–734.e1, doi:10.1016/j.jneb.2016.08.002.
5. Garofalo, C.; Bancalari, E.; Milanović, V.; Cardinali, F.; Osimani, A.; Sardaro, M. L. S.; Bottari, B.; Bernini, V.; Aquilanti, L.; Clementi, F.; Neviani, E.; Gatti, M. Study of the bacterial diversity of foods: PCR-DGGE versus LH-PCR. *International Journal of Food Microbiology* 2017, 242, 24–36, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.11.008.
6. Martinović, T.; Andjelković, U.; Gajdošik, M. Š.; Rešetar, D.; Josić, D. Foodborne pathogens and their toxins. *Journal of Proteomics* 2016, 147, 226–235, doi:10.1016/j.jprot.2016.04.029.
7. Munita, J. M.; Arias, C. A.; Unit, A. R.; Santiago, A. De HHS Public Access. *Mechanisms of Antibiotic Resistance* 2016, 4, 1–37, doi:10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.Mechanisms.
8. Tarvainen, M.; Nuora, A.; Quirin, K. W.; Kallio, H.; Yang, B. Effects of CO₂ plant extracts on triacylglycerol oxidation in Atlantic salmon during cooking and storage. *Food Chemistry* 2015, 173, 1011–1021, doi:10.1016/j.foodchem.2014.10.125.
9. Bouvard, V.; Loomis, D.; Guyton, K. Z.; Grosse, Y.; Ghissassi, F. El; Benbrahim-tallaa, L.; Guha, N.; Mattock, H.; Straif, K.; Agency, I.; Working, M. Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. 2015, 2045, 1–2, doi:10.1016/S1470-2045(15)00444-1.
10. de Albuquerque, U. P.; de Medeiros, P. M.; de Almeida, A. L. S.; Monteiro, J. M.; de Freitas Lins Neto, E. M.; de Melo, J. G.; dos Santos, J. P. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. *Journal of Ethnopharmacology* 2007, 114, 325–354, doi:10.1016/j.jep.2007.08.017.
11. Sharma, A.; Flores-Vallejo, R. del C.; Cardoso-Taketa, A.; Villarreal, M. L. Antibacterial activities of medicinal plants used in Mexican traditional medicine.

- Journal of Ethnopharmacology* 2017, 208, 264–329, doi:10.1016/j.jep.2016.04.045.
12. Tandon, N.; Yadav, S. S. Contributions of Indian Council of Medical Research (ICMR) in the area of Medicinal plants/Traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 2017, 197, 39–45, doi:10.1016/j.jep.2016.07.064.
 13. Redondo-Cuevas, L.; Castellano, G.; Raikos, V. Natural antioxidants from herbs and spices improve the oxidative stability and frying performance of vegetable oils. *International Journal of Food Science and Technology* 2017, 52, 2422–2428, doi:10.1111/ijfs.13526.
 14. Shahid-ul-Islam; Rather, L. J.; Mohammad, F. Phytochemistry, biological activities and potential of annatto in natural colorant production for industrial applications - A review. *Journal of Advanced Research* 2016, 7, 499–514, doi:10.1016/j.jare.2015.11.002.
 15. Gioti, E. M.; Fiamegos, Y. C.; Skalkos, D. C.; Stalikas, C. D. Improved method for the in vitro assessment of antioxidant activity of plant extracts by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-electron capture detection. *Journal of Chromatography A* 2007, 1152, 150–155, doi:10.1016/j.chroma.2007.01.124.
 16. Farag, M. A.; Mohsen, M.; Heinke, R.; Wessjohann, L. A. Metabolomic fingerprints of 21 date palm fruit varieties from Egypt using UPLC/PDA/ESI-qTOF-MS and GC-MS analyzed by chemometrics. *Food Research International* 2014, 64, 218–226, doi:10.1016/j.foodres.2014.06.021.
 17. Wrona, M.; Pezo, D.; Canellas, E.; Nerín, C. Ultra high performance liquid chromatography coupled to quadruple time-of-flight with MS E technology used for qualitative analysis of non-volatile oxidation markers in sliced packed mushrooms (*Agaricus Bisporus*). 2016, 1432, 73–83.
 18. Wiley, J. Metabolite analysis in *Curcuma domestica* using various GC-MS and LC-MS separation Diran Herebian , a † Jeong-Heui Choi , b † A . M . Abd El-Aty , c , d Jae-Han Shim b and. 2009, 951–965, doi:10.1002/bmc.1207.
 19. Li, P.; Anandhisenthilkumar, H.; Wu, S.; Liu, B.; Guo, Z. Comparative UPLC-QTOF-MS-based metabolomics and bioactivities analyses of *Garcinia oblongifolia*. *Journal of Chromatography* 2016, 1011, 179–195, doi:10.1016/j.jchromb.2015.12.061.
 20. Jayaprakasha, G. K.; Rao, L. J.; Sakariah, K. K. Antioxidant activities of curcumin , demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *Food Chemistry* 2006, 98, 720–724, doi:10.1016/j.foodchem.2005.06.037.
 21. Shagufta Naz, S. J. S. I. F. M. F. A. and A. A. Antibacterial activity of *Curcuma longa* varieties against different strains of bacteria. 2010, 42, 1–8.
 22. Acosta-estrada, B. A.; Gutiérrez-uribe, J. A.; Serna-saldívar, S. O. Bound

- phenolics in foods , a review. **Food Chemistry** 2014, 152, 46–55, doi:10.1016/j.foodchem.2013.11.093.
23. Kim, K. J.; Yu, H. H.; Cha, J. D.; Seo, S. J.; Choi, N. Y.; You, Y. O. Antibacterial activity of *Curcuma longa* L. against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Phytotherapy Research** 2005, 19, 599–604, doi:10.1002/ptr.1660.
 24. Zhang, L.; Yang, Z.; Chen, F.; Su, P.; Chen, D.; Pan, W.; Fang, Y.; Dong, C.; Zheng, X.; Du, Z. Composition and bioactivity assessment of essential oils of *Curcuma longa* L. collected in China. **Industrial Crops and Products** 2017, 109, 60–73, doi:10.1016/j.indcrop.2017.08.009.
 25. Jaberian, H.; Piri, K.; Nazari, J. Phytochemical composition and in vitro antimicrobial and antioxidant activities of some medicinal plants. **Food Chemistry** 2013, 136, 237–244, doi:10.1016/j.foodchem.2012.07.084.
 26. Gupta, A.; Mahajan, S.; Sharma, R. Evaluation of antimicrobial activity of *Curcuma longa* rhizome extract against *Staphylococcus aureus*. **Biotechnology Reports** 2015, 6, 51–55, doi:10.1016/j.btre.2015.02.001.
 27. Kozłowska, J.; Potaniec, B.; Zarowska, B.; Anioł, M. Synthesis and biological activity of novel o-alkyl derivatives of naringenin and their oximes. **Molecules** 2017, 22, 1–14, doi:10.3390/molecules22091485.
 28. Bigovic, D.; Stevic, T.; Jankovic, T.; Noveski, N.; Radanovic, D.; Pljevljakusic, D.; Djuric, Z. Antimicrobial activity of *Helichrysum plicatum* DC. **Hemijaska industrija** 2017, 71, 337–342, doi:10.2298/HEMIND160118044B.
 29. Sierra-Alvarez, R.; Lettinga, G. The effect of aromatic structure on the inhibition of acetoclastic methanogenesis in granular sludge. **Applied Microbiology and Biotechnology** 1991, 34, 544–550, doi:10.1007/BF00180586.
 30. Keweloh, H.; Weyrauch, G.; Rehm, H. Phenol-induced membrane changes in free and immobilized *Escherichia coli*. **Applied microbiology and biotechnology** 1990, 33, 66–71.
 31. Heipieper, H. J.; Keweloh, H.; Rehm, H. J. Influence of phenols on growth and membrane permeability of free and immobilized *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology** 1991, 57, 1213–1217.
 32. Smith-Palmer, A.; Stewart, J.; Fyfe, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Lett Appl Microbiol** 1998, 26, 118–122, doi:10.1046/j.1472-765X.1998.00303.x.
 33. Nikaido, H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR** 2003, 67, 593–656, doi:10.1128/MMBR.67.4.593.
 34. Fisher, K.; Phillips, C. A. The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*

- O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. ***Journal of Applied Microbiology*** 2006, *101*, 1232–1240, doi:10.1111/j.1365-2672.2006.03035.x.
35. Millezi, A. F.; Caixeta, D. S.; Rossoni, D. F.; Cardoso, M. das G.; Piccoli, R. H. In vitro antimicrobial properties of plant essential oils thymus vulgaris, cymbopogon citratus and laurus nobilis against five important foodborne pathogens. ***Food Science and Technology (Campinas)*** 2012, *32*, 167–172, doi:10.1590/S0101-20612012005000021.
 36. Gul, N.; Mujahid, T. Y.; Jehan, N.; Ahmad, S. Studies on the Antibacterial Effect of Different Fractions of Curcuma longa Against Urinary Tract Infection Isolates. ***Pakistan Journal of Biological Sciences*** 2004, *7*, 2055–2060.
 37. Gul, P.; Bakht, J. Antimicrobial activity of turmeric extract and its potential use in food industry. ***Journal of Food Science and Technology*** 2015, *52*, 2272–2279, doi:10.1007/s13197-013-1195-4.
 38. Sepahpour, S.; Selamat, J.; Abdul Manap, M.; Khatib, A.; Abdull Razis, A. Comparative Analysis of Chemical Composition, Antioxidant Activity and Quantitative Characterization of Some Phenolic Compounds in Selected Herbs and Spices in Different Solvent Extraction Systems. ***Molecules*** 2018, *23*, 402, doi:10.3390/molecules23020402.
 39. Chaithra, D.; Yasodamma, N.; Alekhya, C. Antidiarrhoeal activity of Curcuma neilgherrensis Wt. ***World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*** 2015, *4*, 545–555, doi:10.20959/wjpps20164-6194.
 40. Burt, S. *Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review.*; 2004; Vol. 94; ISBN 0168160504001.
 41. Negi, P. S. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. ***International Journal of Food Microbiology*** 2012, *156*, 7–17, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.006.
 42. Tiwari, B. K.; Valdramidis, V. P.; O'Donnell, C. P.; Muthukumarappan, K.; Bourke, P.; Cullen, P. J. Application of natural antimicrobials for food preservation. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry*** 2009, *57*, 5987–6000, doi:10.1021/jf900668n.
 43. Lee, J. H.; Cho, S.; Paik, H. D.; Choi, C. W.; Nam, K. T.; Hwang, S. G.; Kim, S. K. Investigation on antibacterial and antioxidant activities, phenolic and flavonoid contents of some thai edible plants as an alternative for antibiotics. ***Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*** 2014, *27*, 1461–1468, doi:10.5713/ajas.2013.13629.
 44. Meneses, N. G. T.; Martins, S.; Teixeira, J. A.; Mussatto, S. I. Influence of extraction solvents on the recovery of antioxidant phenolic compounds from brewer's spent grains. ***Separation and Purification Technology*** 2013, *108*, 152–158, doi:10.1016/j.seppur.2013.02.015.

45. Č, J. J.; Č, R. V.; Štampar, F. Extraction of phenolic compounds from green walnut fruits in different solvents. 2009, 11–15, doi:10.2478/v10014-009-0002-4.
46. Mirzoeva, O. K.; Grishanin, R. N.; Calder, P. C. Antimicrobial action of propolis and some of its components: The effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiological Research* 1997, 152, 239–246, doi:10.1016/S0944-5013(97)80034-1.
47. Owen, R. J.; Palombo, E. A. Anti-listerial activity of ethanolic extracts of medicinal plants, *Eremophila alternifolia* and *Eremophila duttonii*, in food homogenates and milk. *Food Control* 2007, 18, 387–390, doi:10.1016/j.foodcont.2005.11.004.
48. Gómez, G. C.; Castillo, J. C. Q.; Pérez, J. C. A.; Montoya, J. E. Z. Ethanolic extract from leaves of *Bixa orellana* L.: A potential natural food preservative. *Interciencia* 2012, 37, 547–551.
49. Muthukumar, T.; Sankari, D.; Tamil Selvi, A.; Sastry, T. P. Preparation, characterization, and in vitro bioactivity of *Bixa orellana* extract-impregnated collagen microspheres. *Journal of Materials Science* 2014, 49, 5730–5737, doi:10.1007/s10853-014-8291-3.
50. Jalayer-Naderi, N.; Niakan, M.; khodadadi, E.; Mohamadi-Motlagh, M. The antibacterial activity of methanolic *Anacyclus pyrethrum* and *Pistacia lentiscus* L. extract on *Escherichia coli* methanolic extract of *Anacyclus* & *Pistacia* on *E. coli*. *J. Microbiol* 2016, 8, 372–376.
51. Tamil Selvi, A.; Dinesh, M. G.; Satyan, R. S.; Chandrasekaran, B.; Rose, C. Leaf and Seed extracts of *Bixa orellana* L. exert anti-microbial activity against bacterial pathogens. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 2011, 1, 116–120.
52. Wayne, P. *M100-S25 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fifth informational supplement*, 2015; Vol. 35; ISBN 1562389890.
53. Jaakola, L.; Hohtola, A. Effect of latitude on flavonoid biosynthesis in plants. *Plant, Cell and Environment* 2010, 33, 1239–1247, doi:10.1111/j.1365-3040.2010.02154.x.
54. Kumazawa, S.; Hamasaka, T.; Nakayama, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry* 2004, 84, 329–339, doi:10.1016/S0308-8146(03)00216-4.
55. Ecker, K. L. B. Antioxidant Properties of Various Solvent Extracts of Total Phenolic Constituents from Three Different Agroclimatic Origins of Drumstick Tree (*Moringa oleifera* Lam.) Leaves. 2003, 2144–2155.
56. Tilak, J. C.; Banerjee, M.; Mohan, H.; Devasagayam, T. P. A. Antioxidant

- availability of turmeric in relation to its medicinal and culinary uses. *Phytotherapy Research* 2004, 18, 798–804, doi:10.1002/ptr.1553.
57. Acquaviva, R.; Di Giacomo, C.; Vanella, L.; Santangelo, R.; Sorrenti, V.; Barbagallo, I.; Genovese, C.; Mastrojeni, S.; Ragusa, S.; Iauk, L. Antioxidant activity of extracts of *Momordica Foetida* Schumacher et Thonn. *Molecules* 2013, 18, 3241–3249, doi:10.3390/molecules18033241.
 58. Jang, H. Der; Chang, K. S.; Huang, Y. S.; Hsu, C. L.; Lee, S. H.; Su, M. S. Principal phenolic phytochemicals and antioxidant activities of three Chinese medicinal plants. *Food Chemistry* 2007, 103, 749–756, doi:10.1016/j.foodchem.2006.09.026.
 59. Jean B. Patel, Franklin R., J. A.; Institute, C. and L. S. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement*, 2014; Vol. 32; ISBN 1562388975.
 60. BROWN, J. L.; TRAN-DINH, N.; CHAPMAN, B. *Clostridium sporogenes* PA 3679 and Its Uses in the Derivation of Thermal Processing Schedules for Low-Acid Shelf-Stable Foods and as a Research Model for Proteolytic *Clostridium botulinum*. *Journal of Food Protection* 2012, 75, 779–792, doi:10.4315/0362-028X.JFP-11-391.
 61. Ocio, M. J.; Sánchez, T.; Fernandez, P. S.; Rodrigo, M.; Martínez, A. Thermal resistance characteristics of PA 3679 in the temperature range of 110-121°C as affected by pH, type of acidulant and substrate. *International Journal of Food Microbiology* 1994, 22, 239–247, doi:10.1016/0168-1605(94)90175-9.
 62. Ou, B.; Chang, T.; Huang, D.; Prior, R. L. Determination of total antioxidant capacity by oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using fluorescein as the fluorescence probe: First action 2012.23. *Journal of AOAC International* 2013, 96, 1372–1376, doi:10.5740/jaoacint.13-175.
 63. Benzie, I. F. F.; Strain, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “ Antioxidant Power ”: The FRAP Assay. 1996, 76, 70–76.