

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

**PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM
ESPECIARIAS E O USO DE REVESTIMENTO COM PRÓPOLIS NA
REDUÇÃO DA CARGA MICROBIANA**

MILENA DA CRUZ COSTA

**CRUZ DAS ALMAS- BA
JULHO-2019**

**PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM
ESPECIARIAS E O USO DE REVESTIMENTO COM PRÓPOLIS NA
REDUÇÃO DA CARGA MICROBIANA**

MILENA DA CRUZ COSTA

Bióloga

Universidade do Estado da Bahia, 2011

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

Orientadora: Dra. Norma Suely Evangelista-Barreto

Coorientadora: Dra. Aline Simões da Rocha Bispo

CRUZ DAS ALMAS- BA

JULHO-2019

FICHA CATALOGRÁFICA

C837p

Costa, Milena da Cruz.

Perfil de resistência a antimicrobianos em especiarias e o uso de revestimento com própolis na redução da carga microbiana / Milena da Cruz Costa._ Milena da Cruz Costa._ Cruz das Almas, BA, 2019.

90f.; il.

Orientadora: Norma Suely Evangelista-Barreto.

Coorientadora: Aline Simões da Rocha Bispo.

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


1.Microorganismos – Alimentos. 2.Microbiologia – Especiarias. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 576.163

Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas – UFRB.
Responsável pela Elaboração – Antonio Marcos Sarmiento das Chagas (Bibliotecário – CRB5 / 1615).
Os dados para catalogação foram enviados pela usuária via formulário eletrônico.

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

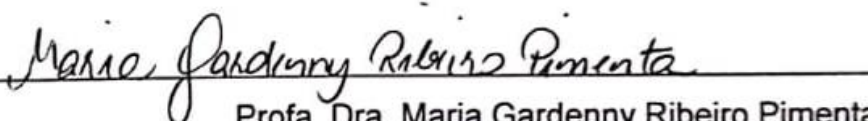
COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
MILENA DA CRUZ COSTA



Profa. Dra. Norma Suely Evangelista Barreto

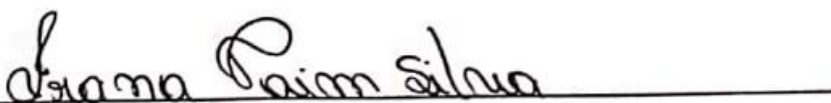
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

(Orientador)



Profa. Dra. Maria Gardenny Ribeiro Pimenta

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia



Dra. Irana Paim Silva

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

"Dissertação homologada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola em _____ conferindo o grau de Mestre em Microbiologia Agrícola em _____."

Ao Grande e poderoso Deus que me permitiu chegar até aqui, aos meus pais, Clodoaldo e Jaciara, pelos ensinamentos e por serem exemplos de vida, ao meu esposo, Luís Gustavo, pelo amor e vivência dos sonhos junto a mim, ao meu irmão, Marcos, à cunhada Katiane e aos sobrinhos Davi, Pedro e Pérola pelo apoio e orações.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** pelo dom da vida, pela força e sabedoria para concluir mais uma etapa, a quem eu devo toda honra e toda glória. “Todas as coisas posso em Cristo que me fortalece”!

Aos meus pais, **Clodoaldo Mota Costa** e **Jaciara da Cruz Costa**, por serem fontes inesgotáveis de amor e pelos melhores ensinamentos para a vida. Nunca me deixaram desanimar frente aos obstáculos, sempre acreditaram em minha capacidade e sem o apoio de vocês nada seria possível.

Ao meu esposo, **Luís Gustavo**, pelo amor, compreensão, ajuda, por dividir comigo as angústias e alegrias e acima de tudo pela paciência em todos os momentos deste trabalho, você sempre me fazendo acreditar que eu conseguiria. Obrigada por ter feito do meu sonho o nosso sonho!

Ao meu irmão, **Marcos Vinicius**, pelo carinho, apoio nas decisões, pelas orações e por todo incentivo, por acreditar que eu seria capaz de vencer!

À minha cunhada **Katiane Bessa**, pela torcida para que eu vencesse mais essa etapa, sempre acreditando em mim e a meus lindos sobrinhos **Davi**, **Pedro** e **Pérola** simplesmente por existirem.

Às minhas avós, tias e tios, por todo o incentivo e apoio. Em especial ao meu tio **Raimundo Sales** que partiu tão cedo, mas que tanto torcia por essa conquista.

À minha cunhada **Patrícia Santana** pelas leituras compartilhadas.

Ao meu sogro, **Antônio** e a minha sogra **Neusa**, pelo incentivo e apoio.

À minha orientadora Profa. Dra. **Norma Suely Evangelista-Barreto**, pela atenção, paciência, orientação, confiança, disponibilidade em compartilhar sua experiência e pelos ensinamentos que muito contribuíram ao meu crescimento profissional.

Às minhas coorientadoras Dra. **Aline Simões da Rocha Bispo** e Dra. **Mariza Alves Ferreira** pela ajuda, disponibilidade e pelo tempo dispensado a dedicar-se às inúmeras contribuições para o progresso deste trabalho.

Ao professor estatístico, **João Albany Costa**, que figura! Obrigada pela paciência e pelos ensinamentos durante a realização das análises estatísticas.

Às amigas, **July Lima** e **Cleusa Bessa**, por desejarem o meu bem. Acreditaram que eu poderia vencer esse desafio! Obrigada pela amizade!

À amiga **Daniela Freire**, que afinidade incrível em tão pouco tempo de convívio nesse mestrado, obrigada pelo apoio durante esses anos, sempre disposta a ouvir e ajudar com muito carinho.

À amiga, **Alexsandra Iarlen**, por cada palavra de encorajamento, pelos dias e madrugadas de estudos, por compartilhar cada momento, choro, sorrisos, angústias, as bobagens e alegrias. Torceu pelo meu sucesso, vibrou pelas conquistas e como você foi importante durante esta caminhada, sempre disposta a ajudar. Você se tornou mais que uma amiga, uma irmã de coração!

Às colegas de mestrado, **Renata, Sanmily, Jaiala e Mariana** por tornar esse momento mais leve compartilhando os momentos vivenciados durante o mestrado.

A todo o grupo do Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Ambiental – LABMAA e toda a equipe do Núcleo de Estudos de Pesca e Aquicultura - NEPA, principalmente aos amigos, **Jéssica, Tiago, Leydi e Rodrigo** pelo carinho, ajuda, prestatividade, companheirismo e alegria.

Às meninas, **Catarine, Renata, Lara, Vitória e Evelyn**, tão dedicadas e que muito contribuíram para a finalização dos experimentos. Chegaram em um momento importante e fizeram diferença.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas pelos conhecimentos compartilhados.

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB pela oportunidade de realização da pós-graduação.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

Ninguém vence sozinho...

OBRIGADA A TODOS!

LISTA DE ABREVIATURAS

- AMP** - Ampicilina
- ATM** - Aztreonam
- Aw** - Atividade de água
- BAM** - Bacteriological Analytical Manual
- CACT** - Cloranfenicol-Acetil-Transferase
- CBM** - Concentração mínima bactericida
- CIM** - Concentração Inibitória Mínima
- CIP** - Ciprofloxacina
- CLO** - Cloranfenicol
- CLSI** - National Committee for Clinical Laboratory Standard
- CRO** - Ceftriaxona
- DAEC** - *E. coli* difusamente aderente
- DIC** - Delineamento Inteiramente Casualizado
- DNA** - Ácido desoxirribonucleico
- DVA** - Doenças Veiculadas por Alimentos
- EAEC** - *E. coli* enteroagregativa
- EAHEC** - *E. coli* enteroagregativa-hemorrágica
- EE** - Enterotoxinas Estafilocócicas
- EHEC** - *E. coli* enterohemorrágica
- EIEC** - *E. coli* enteroinvasora
- EPEC** - *E. coli* enteropatogênica
- ETEC** - *E. coli* enterotoxigênica
- g** - Grama
- GRAS** - Geralmente reconhecido como segura
- h** - Horas
- ICMSF** - Comissão Internacional sobre especificações microbiológicas
- Log** - Logarítimo
- LPS** - Lipopolissacarídeos
- MAR** - Índice de Múltipla Resistência Antimicrobiana
- mg/mL** – Miligrama /Mililitro
- MS** - Ministério da Saúde
- NaCl** - Cloreto de Sódio

NAL - Ácido Nalidíxico

°C - Grau Celsius

OMS - Organização Mundial da Saúde

OXA - Oxacilina

PEN - Penicilina

RNA - Ácido ribonucleico

STEC - *E. coli* produtora de toxina Shiga

SUT - Sulfazotrim

TET- Tetraciclina

UFC - Unidade Formadora de Colônia

μl – Microlitros

μg - Micrograma

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1	Página
Tabela 1. Mecanismo de ação das principais classes de antimicrobianos.	33
Capítulo 2	
Tabela 1. Média microbiana ($\log x+1$) UFC g^{-1} e NMP g^{-1} dos bioindicadores em três especiarias comercializadas em feiras livres do Recôncavo Baiano.	63
Tabela 2. Índice de múltipla resistência aos antimicrobianos (MAR) isoladas de especiarias.	68
Capítulo 3	
Tabela 1. Atividade antimicrobiana do extrato de própolis marrom frente a bactérias Gram-negativa e Gram-positiva.	81

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1	Página
Figura 1. Mecanismos de resistência aos antimicrobianos.	34
Capítulo 2	
Figura 1. Presença de <i>Escherichia coli</i> e <i>Salmonella</i> spp. na pimenta-do-reino, canela e orégano comercializados em feiras livre de municípios do Recôncavo Baiano.	64
Figura 2. Dispersão, posicionamento dos escores e cargas fatoriais da superposição do perfil antimicrobiano de <i>Bacillus cereus</i> / <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Salmonella</i> spp./ <i>Escherichia coli</i> .	66
Capítulo 3	
Figura 1. Efeito do revestimento de própolis na pimenta-do-reino para contagem de <i>Bacillus cereus</i> durante 30 dias de armazenamento.	82
Figura 2. Efeito do revestimento de própolis na pimenta-do-reino para contagem de <i>Staphylococcus aureus</i> durante 30 dias de armazenamento.	82
Figura 3. Efeito do revestimento de própolis na pimenta-do-reino para contagem de bactérias mesófilas durante 30 dias de armazenamento.	83

ÍNDICE

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO 15

CAPÍTULO 1

O consumo de especiarias e os riscos envolvendo a comercialização em feiras livres: como minimizarmos este problema? 17

Resumo 18

Abstract 19

1. Feiras livres 20

2. Especiarias 21

3. Qualidade microbiológica das especiarias 24

 3.1 Coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* 25

 3.2 *Staphylococcus aureus* 27

 3.3 *Salmonella* spp. 28

 3.4 *Bacillus cereus* 29

4. Resistência antimicrobiana 30

 4.1 Mecanismos de ação dos antimicrobianos 31

 4.2 Mecanismos de resistência 34

5. Tecnologias de conservação em especiarias 35

 5.1 Revestimento edível 36

 5.2 Própolis 39

REFERÊNCIAS 42

CAPÍTULO 2

Risco da veiculação de bactérias resistentes a antimicrobianos em especiarias comercializadas em feiras livres 56

RESUMO 57

ABSTRACT 58

INTRODUÇÃO	58
MATERIAL E MÉTODOS	60
Coleta das amostras	60
Análises microbiológicas	60
Teste de suscetibilidade antimicrobiana	61
Índice de múltipla resistência antimicrobiana (MAR)	61
Análise estatística	62
RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
CONCLUSÃO	69
AGRADECIMENTOS	69
REFERÊNCIAS	69
CAPÍTULO 3	
Atividade antimicrobiana do revestimento edível da própolis marrom na pimenta-do-reino	75
RESUMO	76
ABSTRACT	77
INTRODUÇÃO	77
MATERIAL E MÉTODOS	78
Obtenção do extrato da própolis	78
Obtenção e preparação das amostras de pimenta	79
Atividade antibacteriana do extrato de própolis marrom	79
Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato	79
Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato de própolis marrom	80
Preparação da suspensão de revestimento	80
Avaliação da vida útil da pimenta-do-reino	81
Análise estatística	81
RESULTADOS	81
DISCUSSÃO	84
CONCLUSÃO	86
AGRADECIMENTOS	87
REFERÊNCIAS	87
CONSIDERAÇÕES FINAIS	91

RESUMO

Costa, M. C. Perfil de resistência a antimicrobianos em especiarias e o uso de revestimento com própolis na redução da carga microbiana

O objetivo deste trabalho foi analisar a qualidade microbiológica das especiarias comercializadas em três feiras livres do Recôncavo Baiano, verificar o perfil de resistência das cepas isoladas e testar o efeito do extrato hidroalcoólico da própolis marrom no controle microbiológico da pimenta-do-reino. Foram realizadas análises microbiológicas para coliformes a 45 °C, *Bacillus* spp., *B. cereus*, *Staphylococcus* spp., *S. aureus*, *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*. Para a atividade antimicrobiana da própolis marrom foi verificada a concentração inibitória mínima e posteriormente a pimenta-do-reino foi submetida ao Controle e aos seguintes tratamentos: T1 (AS1% + 2,5% de própolis), T2 (AS1% + 5% de própolis), T3 (AS1% + 10% de própolis) e T4 (AS1% + 15% de própolis) com armazenamento durante 30 dias a temperatura de 25 °C. A contagem microbiana da pimenta-do-reino foi maior (4,66 log UFC g⁻¹) e *B. cereus* apresentou maior contagem (4,52 log UFC g⁻¹). *E. coli* e *Salmonella* spp. foram isoladas na pimenta-do-reino em 89% e 67% das amostras, respectivamente. *B. cereus* e *S. aureus* apresentaram maior resistência à penicilina, *E. coli* a ampicilina e *Salmonella* spp. ao ácido nalidíxico, ampicilina e ceftriaxona. Todos os microrganismos apresentaram cepas multirresistentes com *Salmonella* spp. resistente até 11 antimicrobianos (índice MAR 0,91). Em ordem crescente a própolis marrom foi mais eficiente na inibição de *S. aureus* (CIM, 0,1 mg mL⁻¹), *B. cereus* (CIM 0,5 mg mL⁻¹) e *E. coli* (CIM, 18 mg mL⁻¹). No tratamento da pimenta-do-reino o tratamento T1 inibiu 100% dos coliformes a 45 °C. De acordo com o coeficiente de regressão o aumento em 5% da própolis reduziu aproximadamente 7 vezes a contagem de *B. cereus*, 9,4 de *S. aureus* e 5,4 das bactérias mesófilas, com o tratamento T4 sendo o mais eficiente em 20 dias. A qualidade microbiológica das especiarias comercializadas nas feiras livres do Recôncavo Baiano apresenta baixa qualidade microbiológica, além de veicular bactérias multirresistentes. O uso do revestimento com a própolis marrom é uma alternativa viável para minimizar a carga microbiana devido a sua eficiência como antimicrobiano natural.

Palavras-chave: Multirresistência, *Salmonella* spp., Pimenta-do-reino, Segurança alimentar.

ABSTRACT

Costa, M. C. Profile of resistance to antimicrobials in spices and the use of coating with propolis in microbial load reduction

The aim of this study was to analyse the microbiological quality of the spices marketed in three street market of the Recôncavo Baiano, to verify the resistance profile of the isolated strains and to test the effect of the extract of the brown propolis on the microbiological control of the black pepper. Analyzes were performed for coliforms at 45 °C, *Bacillus* spp., *Bacillus cereus*, *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. and *Escherichia coli*. For the antimicrobial activity of the brown propolis extract, the minimum inhibitory concentration was verified, and afterwards the pepper was submitted to the Control and following treatments: T1 (1% sodium alginate + 2.5% propolis), T2 (1% sodium alginate + 5% propolis), T3 (1% sodium alginate + 10% propolis) and T4 (1% sodium alginate + 15% propolis) with storage for 30 days at temperature 25 °C. The microbial load of black pepper was higher (4.66 log CFU g⁻¹) with *B. cereus* showing a higher count (4.52 log CFU g⁻¹). *E. coli* and *Salmonella* spp. were isolated in the pepper in 89% and 67% of the samples, respectively. *B. cereus* and *S. aureus* showed greater resistance to penicillin, *E. coli* to ampicillin and *Salmonella* spp. to nalidixic acid, ampicillin and ceftriaxone. All the microorganisms presented multiresistant strains with *Salmonella* spp. resistant to 11 antimicrobials (MAR index 0,91). In order of increasing order, brown propolis was more efficient in inhibiting *S. aureus* (MIC, 0.1 mg mL⁻¹), *B. cereus* (MIC 0.5 mg mL⁻¹). *E. coli* (MIC, 18 mg mL⁻¹). In the treatment of black pepper, T2 inhibited 100% of the coliforms at 45 °C. According to the regression coefficient the 5% increase in propolis reduced the counts of *B. cereus*, 9.4 of *S. aureus* and 5.4 of mesophilic bacteria by approximately 7 times, with the T4 treatment being the most efficient in 20 days. The microbiological quality of the spices sold in the street markets of the Recôncavo Baiano presents low microbiological quality, in addition to serve resistant bacteria. As a result, the use of the coating with brown propolis is a viable alternative to minimize the microbial load due to its efficiency as a natural antimicrobial.

Key words: Multiresistance, *Salmonella* spp., *Piper .nigrum* L.

INTRODUÇÃO

Especiarias são produtos aromáticos vegetais, derivadas de partes de plantas, como folhas, rizomas, caules, flores, frutos, sementes e cascas (FOGELE et al., 2018). Mundialmente, são utilizadas na preparação de alimentos conferindo-lhes sabor e aroma diferenciados, além de ser responsáveis por efeitos benéficos para a saúde, como a melhoria do processo digestivo. Dentre as substâncias responsáveis por essas propriedades se destacam os óleos voláteis, ácidos essenciais, alcaloides e flavonoides (GULDIKEN et al., 2018).

As especiarias estão sujeitas à contaminação microbiana, principalmente quando são expostas às precárias condições, nas práticas agrícolas, secagem, armazenamento e transporte (GARBOWSKA; BERTHOLD-PLUTA; STASIAK-ROSANSKA, 2015). Por este motivo, as especiarias podem ser veículos de bactérias patogênicas ao ser adicionadas principalmente a alimentos que não passaram por cocção, ocasionando riscos à saúde do consumidor (NEI; ENOMOTO; NAKAMURA, 2015).

No Brasil, dados do Ministério da Saúde (MS) mostram que no período de 2009 a 2018, as especiarias estiveram envolvidas em 0,9% dos surtos alimentares, tendo como principais agentes etiológicos envolvidos, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* e *Staphylococcus aureus* (BRASIL, 2019). Dessa forma, é necessário se atentar para a comercialização destes produtos em feiras livres devido às condições de higiene que muitas vezes são deficientes o excesso de manipulação e o maior fluxo de pessoas e animais que favorecem a proliferação de microrganismos patogênicos (MARTINS; FERREIRA, 2011). Além desses fatores, a saúde pública tem se preocupado a cada ano com a veiculação de cepas resistentes aos agentes antimicrobianos, uma vez que o nível de resistência aos fármacos registrados na última década tem sido uma séria ameaça à saúde global (WHO, 2014), uma vez que as bactérias resistentes aos antimicrobianos têm sido responsáveis por 700.000 mortes a cada ano em todo o mundo (CANIÇA et al., 2019).

O aumento de patógenos resistentes tem dificultado o tratamento de infecções bacterianas em decorrência do desenvolvimento de mecanismos de resistência pelos microrganismos (EVANGELISTA-BARRETO et al., 2017),

principalmente aos β -lactâmicos que compõem uma importante classe de fármacos voltados a tratamentos de infecções bacterianas (SILVA et al., 2013).

Uma alternativa para a redução da carga microbiana nos produtos alimentícios é a aplicação de revestimento edível que pode ser utilizada para a conservação dos alimentos em virtude da fácil aplicação e por ser uma excelente escolha para substituir os conservantes químicos (NAIR; SAXENA; KAUR, 2018). Os revestimentos podem ser a base de polissacarídeos, proteínas e lipídeos, derivados de várias fontes naturais, utilizados isoladamente ou combinados. Dentre os polissacarídeos, o alginato de sódio, tem se destacado devido à sua capacidade de formar gel em soluções aquosas, além de agir como uma matriz eficaz na retenção de compostos bioativos (OMS-OLIU et al., 2008).

A utilização de substâncias naturais como a própolis, apresenta um grande potencial para as novas tecnologias alimentícias devido à presença de compostos bioativos, como flavonoides (como a galangina, pinocembrina e kaempferol) e compostos fenólicos (como os derivados do ácido caféico e ácido cinâm) devido suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes (POBIEGA et al., 2019). Estudos têm sido realizados com a aplicação de revestimentos edíveis contendo extrato de própolis a fim de manter a qualidade e o armazenamento prolongado de várias frutas como banana (PASSOS et al., 2016) e uvas (PASTOR et al., 2011). No entanto, até o momento não foram realizadas pesquisas utilizando o extrato de própolis no revestimento de especiarias.

Esta dissertação está dividida em três capítulos. O primeiro capítulo é referente à revisão de literatura com abordagens sobre os temas relacionados ao estudo, embasando-o teoricamente. O segundo capítulo, na forma de artigo, se refere à qualidade microbiológica das especiarias e o perfil de suscetibilidade antimicrobiana das cepas isoladas, já o terceiro capítulo, também em forma de artigo, aborda a atividade antimicrobiana do revestimento de extrato de própolis em pimenta-do-reino.

CAPÍTULO 1

O consumo de especiarias e os riscos envolvendo a comercialização em feiras livres: como minimizarmos este problema?

RESUMO

Mundialmente, as especiarias são utilizadas como agentes aromatizantes na preparação de alimentos, e amplamente comercializadas em feiras livres, na forma desidratada, moída e a granel. Muitas vezes, estes produtos chegam aos consumidores com baixa qualidade microbiológica, como resultado de falhas higiênico-sanitárias no plantio, colheita, secagem, armazenamento, transporte, moagem e manuseio. Além disso, fatores ambientais como altas temperaturas e umidade também podem afetar a qualidade das especiarias, aumentando o desenvolvimento de microrganismos deterioradores ou responsáveis por surtos de doenças veiculadas por alimentos. Outra problemática que envolve a comercialização de alimentos é a presença de cepas resistentes aos fármacos comerciais, considerado um problema de escala global decorrente do uso indiscriminado dos antimicrobianos. As bactérias resistentes encontradas nas especiarias podem estar relacionadas com a utilização de esterco na adubação, um dos fatores responsáveis pela disseminação de antimicrobianos no ambiente. Nessa perspectiva, o consumo de especiarias pode representar um risco para a saúde pública, por conter microrganismos resistentes, principalmente quando adicionadas as refeições que não são submetidas à cocção. Diante disso, a busca por compostos naturais, como a própolis, que apresenta alto teor de polifenol, tem atraído à atenção de pesquisadores quanto ao seu uso na conservação de alimentos, por ser uma alternativa para prolongar a vida útil do produto e minimizar a carga microbiana, devido às suas propriedades biológicas, como antibacterianas, antifúngicas e antioxidantes. Com isso, a aplicação do extrato de própolis traz uma nova abordagem tecnológica para revestimentos edíveis em especiarias.

Palavras-chave: Segurança alimentar, *Piper nigrum* L., *Origanum vulgare* L., *Cinnamomum* spp., Antimicrobiano natural

ABSTRACT

Worldwide, spices are used as flavoring agents in food preparation. They are marketed in street markets, in the form of dehydrated and in most cases, ground and in bulk. However, these products can reach consumers with low microbiological quality as a result of hygienic-sanitary failures in planting, harvesting, drying, storage, transport, grinding and handling. In addition, environmental factors such as high temperatures and humidity can also affect the quality of spices, increasing the development of deteriorating microorganisms or responsible for outbreaks of foodborne diseases. Another problem that involves the commercialization of foods with high microbial load is the presence of commercial drug resistant strains, considered a global scale problem due to the indiscriminate use of these antimicrobials. Resistant bacteria found in spices may be related to the use of manure in fertilization, one of the factors responsible for the spread of antimicrobials in the environment. In this perspective, the consumption of spices may represent a risk to public health, since it contains resistant microorganisms, especially when added to the meals that are not submitted to cooking. Therefore, the search for natural compounds, such as propolis, which has a high content of polyphenol, has attracted the attention of researchers because of its use in food preservation, as it is an alternative to extend the useful life of the product and minimize the load microbial, due to its biological properties, such as antibacterial, antifungal and antioxidants. With this, the application of propolis extract brings a new technological approach to edible coatings in spices.

Key words: Food safety, *Piper nigrum* L., *Origanum vulgare* L., *Cinnamomum* spp., Natural antimicrobial

1. FEIRAS LIVRES

No Brasil, as feiras livres remontam ao período colonial, quando se estabeleceram pontos de vendas de diversos produtos, como alimentos, roupas e calçados possibilitando a prestação de serviços acessíveis à população e suprimindo a necessidade da grande demanda de consumidores (SOUZA; ATAYDE, 2017).

A feira é um comércio importante no processo de trocas inter-regionais, principalmente nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, representando fundamental meio de sobrevivência para as pequenas cidades dessas regiões. Esse mercado informal atingiu maiores proporções em decorrência da baixa oferta de empregos, possibilitando o trabalho alternativo para o sustento de muitas famílias (ALCÂNTARA; KATO, 2016). De modo geral, há uma preferência do consumidor pelas feiras livres devido à crença de que os alimentos comercializados nesses locais são sempre frescos, de qualidade superior e preço mais acessível. No entanto, a venda de alimentos em feiras livres pode comprometer a qualidade microbiológica dos produtos ofertados e conseqüentemente à saúde do consumidor caso as condições higiênicas sanitárias não sejam satisfatórias (SANTOS et al., 2014).

Entre os produtos alimentícios comercializados nas feiras livres, as especiarias são muito procuradas por atribuir características sensoriais agradáveis aos alimentos, como cor, sabor e aroma, além de sua utilização para fins medicinais (CUNHA et al., 2016). Na maioria das vezes as condições higiênicas de comercialização das feiras são consideradas inadequadas e podem contribuir na contaminação de produtos alimentícios proporcionando a proliferação de microrganismos que são responsáveis por doenças veiculadas por alimentos (DVA) (MARTINS; FERREIRA, 2018).

Nos estudos de Golin et al. (2016) foi comprovada a falta de segurança higiênicossanitária em feiras livres de Santa Maria/RS devido à baixa qualidade microbiológica dos produtos e ausência de boas práticas no manuseio dos alimentos comercializados. Na pesquisa de Silva et al. (2013) as especiarias comercializadas na feira central de Campina Grande/PB estavam impróprias para o consumo devido à presença de microrganismos patogênicos que foram associados à má higienização, processamento e armazenamento inadequado.

No Recôncavo Baiano as feiras livres se caracterizam como uma forma de mercado varejista ao ar livre. Elas são organizadas semanalmente, funcionando principalmente aos sábados, como serviço de utilidade pública dos municípios voltada para a comercialização de produtos da região. Alguns feirantes comercializam os produtos provenientes da agricultura familiar, enquanto a maioria negocia produtos trazidos de regiões próximas (MATOS et al., 2018).

2. ESPECIARIAS

As especiarias são substâncias vegetais de origem indígena ou exótica, aromáticas ou de sabor forte, picantes, que são utilizadas para realçar o sabor dos alimentos. São constituídas por partes de uma ou mais espécies vegetais como, raízes, rizomas, bulbos, cascas, folhas, flores, frutos, sementes e talos (BRASIL, 2005; BRACHT, CONCEIÇÃO, SANTOS, 2011).

Na Idade Média, período entre 500 a 1500 D.C, as especiarias eram importadas e consideradas produtos exóticos, sendo a categoria de maior prestígio da época. Estas plantas são utilizadas desde a antiguidade para prevenir doenças, melhorar a saúde e o bem-estar, além de ser usadas como ingredientes na fabricação de cosméticos (FREEDMAN, 2015).

As especiarias têm sido reconhecidas por sua ação antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória e anticancerígena, além de atuarem melhorando o processo digestivo (SILVA et al., 2012) por meio do aumento da produção de suco gástrico devido aos compostos fitoquímicos como os ácidos fenólicos e flavonoides (GULDIKEN et al., 2018).

A indústria global de especiarias, avaliada em aproximadamente quatro bilhões (GALVIN-KING; HAUGHEY; ELLIOTT, 2018), está crescendo devido ao interesse dos consumidores em utilizar esses produtos naturais. Em 2017, a produção mundial de especiarias aumentou em 14,98% com destaque para a Ásia que responde por 95% da produção. Os principais países produtores de especiarias são a Índia, Turquia, Bangladesh e China (FAOSTAT, 2017).

No Brasil, dados sobre a produção de especiarias ainda é pouco explorado, embora haja uma perspectiva de expansão do mercado brasileiro de 22% para o ano de 2019 (HORTIFRUTI BRASIL, 2015). No Estado da Bahia, as maiores produções de especiarias se concentram nos municípios de Valença, Presidente Tancredo Neves, Taperoá, Santo Amaro, Prado, Porto Seguro, Belmonte,

Itamaraju, Itabela, Itaji, Canavieiras e Guarantiga, todos localizados no Sul e Baixo Sul da Bahia, regiões que possuem fatores climáticos que favorecem o cultivo, a exemplo do clima quente e úmido (OLIVEIRA; OLIVEIRA; SACRAMENTO, 2007).

Dentre as especiarias mais importantes cultivadas no mundo, a pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) se destaca com produção mundial de aproximadamente 462 milhões de toneladas no ano de 2017, sendo que os maiores produtores foram Vietnã, Indonésia, Bulgária, Índia, Brasil e China (FAOSTAT, 2017). Em relação à produção nacional, a pimenta-do-reino ocupa a quarta posição e o Estado do Pará é o grande produtor nacional, seguido do Espírito Santo e Bahia. Esses três estados somam quase 98% da produção brasileira (HORTIFRUTI BRASIL, 2015).

A pimenta-do-reino é uma planta trepadeira, da família das Piperaceae, originária da Índia e conhecida como o “rei das especiarias” (SRINIVASAN, 2007; GHODKI; GOSWAMI, 2016). Os grãos, inteiros ou moídos, são utilizados na culinária de diversos países como condimento, principalmente em indústrias de carnes e conservas (BUTT et al., 2013). A pimenta-do-reino além de ser utilizada como conservante de alimentos, também é bastante usada na medicina tradicional, como tratamento de constipação, dores de dente, abscessos orais, entre outros (ZHU; MOJEL; LI, 2017).

A procura pela pimenta-do-reino para o consumo humano tem crescido devido às suas implicações na saúde, como atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas e gastroprotetoras. Os benefícios da pimenta são atribuídos a seus componentes bioativos como a piperina, polifenóis, fibra alimentar e óleos essenciais (ZARAI et al., 2013). Além disso, outra importância da pimenta-do-reino é o fato de apresentar elevados teores de alcaloides em seus frutos, que lhe confere o sabor picante característico (BUTT et al., 2013).

Outra especiaria muito apreciada é a canela, obtida das árvores pertencentes ao gênero *Cinnamomum* (família Lauraceae). Seu nome é derivado de uma palavra grega que significa madeira doce e o composto responsável por esse sabor é o cinamaldeído. Dentre as diferentes aplicações da canela, a sua utilização na alimentação, seja de forma inteira ou triturada, extratos ou óleos obtidos da folha ou casca são muito atrativas devido às suas propriedades aromatizantes (RIBEIRO-SANTOS et al., 2017).

O aumento no consumo da canela em dieta de milhares de pessoas tem sido uma tendência em todo o mundo, devido às suas ações, anti-inflamatória e antimicrobiana, além da inibição da proliferação de células cancerígenas e controle glicêmico (KAWATRA; RAJAGOPALAN, 2015; PENDER et al., 2018). Essas propriedades têm despertado grande interesse na comunidade científica e os estudos de Zare et al. (2019) confirmaram a eficácia das propriedades da canela ao verificarem que melhora índices glicêmicos de pacientes com diabetes tipo II.

O orégano (*Origanum vulgare* L.) é uma especiaria pertencente à família Lamiaceae, originário da Europa e da Ásia, muito utilizada como tempero, encontrado na forma desidratada. O seu sabor e aroma se tornam mais acentuados devido à presença de componentes voláteis, como o carvacrol e o timol. O orégano é mais utilizado na culinária brasileira na forma de folhas e ramos para dar sabor a vários alimentos, como saladas, pizzas, molhos, carnes e peixes (MORSHEDLOO et al., 2018).

O. vulgare é conhecida por sua atividade antimicrobiana, conferida pela presença do alto teor de óleos voláteis e pela atividade antioxidante que está relacionada aos compostos fenólicos, incluindo os flavonoides, taninos, esteróis e triterpenos. Esses compostos apresentam diversas atividades biológicas, como por exemplo, anti-úlceras, anti-inflamatória, antidiabética, antiviral, citotóxica e antitumoral (ZHANG et al., 2014; KHAN et al., 2018).

O. vulgare tem a produção global estimada em 60.000 toneladas. Dentre os principais países produtores estão os Estados Unidos, México, Turquia, Grécia, Israel e Marrocos. Os principais países importadores do orégano foram Estados Unidos com 16% das importações, seguido pelo Japão e Alemanha, ambos com 10%. Em relação aos países exportadores se destacaram a China (36%), Índia (10%) e Alemanha (7%) (FAO, 2014). No Brasil, as pesquisas têm sido intensificadas visando aprimorar o processo produtivo do orégano e reduzir as quantidades importadas, tendo em vista que a produção nacional é, ainda, muito limitada, até mesmo na agricultura familiar (HORTIFRUTI BRASIL, 2015).

Diante disso, é importante enfatizar a importância das especiarias pimenta-do-reino, canela e orégano na culinária típica da região Nordeste, na qual se verifica o uso frequente para acrescentar sabores diferenciados nas refeições. Assim, o cenário para o mercado de especiarias aumenta em todas as regiões,

principalmente, na culinária baiana, onde elas são indispensáveis nas receitas de pratos típicos, como moquecas, doces e mingaus.

3. QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DAS ESPECIARIAS

As especiarias estão sujeitas à contaminação por microrganismos patogênicos e toxigênicos que podem causar sérios danos na saúde e na indústria alimentícia (SZÉKÁCS et al., 2018). É importante verificar a qualidade microbiológica das especiarias devido ao estado higiênico no qual estes produtos são processados (NETO; SILVA; MACHADO, 2013), muitas vezes produzidos e colhidos em áreas quentes e úmidas favorecendo o crescimento de microrganismos indesejáveis que podem ocorrer em diferentes estágios, desde a produção, colheita, estocagem, distribuição, manipulação ou até mesmo por meio do armazenamento inadequado por parte dos consumidores (GARBOWSKA; BERTHOLD-PLUTA; STASIAK-RÓŜAŃSKA, 2015).

As especiarias podem representar um risco para a saúde pública, uma vez que constituem as principais fontes de bactérias formadoras de esporos em diversos alimentos, como sopas, alimentos cozidos e molhos. Quando adicionados a alimentos que possuem alta umidade, as populações microbianas se desenvolvem rapidamente e deterioram os alimentos ou se multiplicam em nível elevado podendo causar infecção ou intoxicação alimentar (FOGELE et al., 2018).

A veiculação de bactérias em alimentos é confirmada pelo Ministério da Saúde por meio de dados referentes a surtos alimentares ocorridos no Brasil, onde as bactérias representaram 95,9% dos microrganismos envolvidos com destaque para *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e coliformes (BRASIL, 2017). Dados sobre a incidência de surtos alimentares no Brasil mostram que no ano de 2016 foram registrados 538 surtos de DVA e 9.935 casos, contra 598 surtos e 9.320 casos no ano de 2017. No período de 2007 a 2017, a região Nordeste ocupou a segunda posição com notificações de casos de DVA (BRASIL, 2018).

Nos anos de 1973 a 2010, nos Estados Unidos, Canadá, Grã-Bretanha, França, Alemanha, Dinamarca e Noruega, o consumo de especiarias e ervas contaminadas causaram 1.946 casos de intoxicações alimentares, 128 hospitalizações e duas mortes. *Salmonella entérica* e *Bacillus* spp. foram os

patógenos bacterianos mais comuns ligados a surtos associados a especiarias (VAN DOREN et al., 2013).

No Brasil, no período de 2009 a 2018 foi confirmado o envolvimento de especiarias em 0,9% dos casos de surtos alimentares (BRASIL, 2019). No entanto, esses números representam apenas os casos identificados e relatados, pois muitas notificações de DVA não são registradas pelos sistemas de vigilância de saúde pública devido ao subdiagnóstico ou subnotificação (KIM et al., 2015).

A avaliação microbiológica das especiarias é realizada em diferentes países do mundo como alternativa no controle de qualidade da cadeia produtiva. A partir das análises é possível identificar a quantidade e os tipos de microrganismos presentes (SCHAARSCHMIDT et al., 2016; LINS, 2018). De acordo com a Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001 que estabelece os padrões microbiológicos para especiarias íntegras ou moídas é permitido até 5×10^2 NMP/g para coliformes termotolerantes e ausência de *Salmonella* spp. em 25 g de produto (BRASIL, 2001). O Code of Hygienic Practice destaca que nestes produtos não devem conter microrganismos produtores de toxinas em quantidades que possam aumentar os riscos para a saúde (CAC, 1995; CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2014; GALVIN-KING; HAUGHEY; ELLIOTT, 2018).

A European Commission estabelece que em 25 g de especiarias não deve exceder os níveis máximos de *E. coli* $\leq 10^2$ UFC/g e *B. cereus* $\leq 10^4$ UFC/g (EC, 2004). Os critérios microbiológicos para especiarias estabelecidos pela Comissão Internacional sobre Especificações Microbiológicas para alimentos declaram que as especiarias são de qualidade inaceitável quando a contagem bacteriana total excede 6 log UFC/g (ICMSF, 1974).

3.1 Coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*

O grupo de coliformes termotolerantes ou a 45 °C são bactérias que pertencem à família Enterobacteriaceae, se apresentam na forma de bastonetes Gram-negativos, anaeróbios facultativos, não esporogênicos, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 horas a 44,5 °C. Podem ser encontrados no solo, na água, em plantas e no trato intestinal do homem e animais homeotérmicos. Os coliformes termotolerantes abrangem os gêneros

Escherichia, *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella* (CARDOSO et al., 2001; SALES et al., 2015; CAVALCANTE; FERREIRA; NETO, 2018).

E. coli é a principal causadora de doenças diarreicas ocasionadas pela ingestão de água e alimentos contaminados. São microrganismos Gram-negativos, em forma de bastonetes, com presença de flagelos peritríquios, reduzem nitrato a nitrito, fermentam glicose e é oxidase-negativa. Metaboliza uma ampla variedade de substâncias como carboidratos, proteínas, aminoácidos, lipídeos e ácidos orgânicos, produz catalase, utiliza glicose, amônia e nitrogênio como fontes de carbono, com temperatura ótima de crescimento a 37 °C (NATARO; KAPER, 1998; KAPER; NATARO; MOBLEY et al., 2004; CAVALCANTE; FERREIRA; NETO, 2018).

E. coli faz parte da flora comensal do intestino de humanos e outros animais de sangue quente, sendo a maioria delas consideradas inofensivas aos humanos (GOMES et al., 2016). No entanto, algumas estirpes podem se tornar patogênicas e infectar o intestino provocando doenças como diarreia, meningite, septicemia, infecções do trato urinário, assim como intoxicações alimentares (CLEMENTS et al., 2012).

Com base nos mecanismos de virulência, manifestações clínicas, epidemiologia e sorotipagem, as linhagens de *E. coli* são classificadas em: *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* difusamente aderente (DAEC) e *E. coli* enteroagregativa-hemorrágica (EAHEC). Entre estes grupos a EHEC é, provavelmente, a mais importante em termos de infecções alimentares e o principal sorotipo envolvido é o O157: H7 (GÓMEZ-ALDAPA et al., 2016; VÁSQUEZ-GARCÍA et al., 2019).

A presença de *E. coli* em alimentos evidencia déficit higiênicossanitário durante a produção, processamento ou preparação, além de indicar contaminação fecal e presença de outros microrganismos patogênicos, que podem comprometer a saúde e o bem-estar dos consumidores (ATNAFIE et al., 2017). Segundo os dados do Ministério da Saúde sobre o perfil epidemiológico dos agentes etiológicos associado à DVA, *E. coli* ocupa o primeiro lugar dos surtos no país (BRASIL, 2019).

Nos estudos de Loyola et al. (2014), a qualidade microbiológica de especiarias em Pouso Alegre/MG foi avaliada e a presença de *E. coli* foi detectada nas amostras de louro em pó, cravo, manjeriço e orégano. Para os autores embora as especiarias apresentassem propriedades antimicrobianas comprovadas é possível detectar o crescimento de microrganismos.

3.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus constitui uma espécie bacteriana pertencente à família Micrococcaceae, são cocos Gram-positivos, não esporulados, com aproximadamente 1,0 µm de diâmetro. O nome *Staphylococcus* é originário de duas palavras gregas “*Staphyle*” e “*cocci*” que significa cacho de uvas e o nome *aureus* do latim significa ouro devido à coloração amarela característica das colônias (ARGUDIN et al., 2012; RUBAB et al., 2018).

São bactérias mesófilas, anaeróbias facultativas, que podem apresentar diversos arranjos. Geralmente crescem em pH 7,0 na faixa ótima de temperatura de 37 °C. São tolerantes às concentrações de até 20% de NaCl e a produção de enterotoxina ocorre em concentrações de 10% (ALMEIDA et al., 2016; FEITOSA et al., 2017). São frequentemente encontradas na cavidade nasal e na pele do ser humano e têm sido responsáveis por várias doenças infecciosas, incluindo infecções cutâneas leves até infecções mais graves como pneumonia, meningite, endocardite e septicemia (SANTANA et al., 2010; LI et al., 2019).

A intoxicação alimentar por *S. aureus* é uma das DVA mais comum, resultante da ingestão de enterotoxinas estafilocócicas (EE) pré-formadas em alimentos. As EE incluem SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SHE e SEI, além da toxina da síndrome do choque tóxico-1 (TSST-1) e leucocidina (FLEUROT et al., 2014). Essas toxinas são resistentes ao calor e podem sobreviver no alimento mesmo quando submetido a tratamento térmico. Além disso, são resistentes a outras condições ambientais, como baixo pH, secagem e congelamento (KADARIYA; SMITH; THAPALIYA, 2014). Devido a essas características, este microrganismo é considerado uma ameaça significativa para a indústria de alimentos (RUBAB et al., 2018).

Na pesquisa de Silva et al. (2013), as especiarias processadas e desidratadas obtidas da Feira Central de Campina Grande-PB estavam impróprias para o consumo devido à presença de *S. aureus* identificado em 100%

das amostras. O crescimento de *S. aureus* foi associado à má higiene e armazenamento inadequado dos produtos.

3.3 *Salmonella* spp.

Salmonella é um grupo de bastonetes Gram-negativos, móveis, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos, pertencentes à família Enterobacteriaceae. Caracteriza-se como catalase positiva, oxidase negativa, se desenvolvendo no intervalo de temperatura entre 5 °C e 47 °C, apresentam crescimento ótimo na faixa de 35 °C a 37 °C e são frequentemente encontradas no trato intestinal de diversos animais (NORHANA et al., 2010; VELGE et al., 2012). O gênero *Salmonella* consiste em apenas duas espécies, *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica*, sendo esta última dividida em seis subespécies: enterica, salamae, arizonae, diarizonae, houtenae e indica. Mais de 2.500 sorovares diferenciados pela sua composição antigênica já foram identificados (CHELSEA; SIMON, 2018).

Esta bactéria entérica é responsável por graves intoxicações alimentares, sendo a principal via de transmissão oral-fecal. Além da ingestão de alimentos, a pessoa pode adquirir a infecção por contato com os animais infectados, ou por meio do contato com superfícies contaminadas (CARDOSO; TESSARI, 2013). *Salmonella* é considerada uma das principais causas de gastroenterite bacteriana humana aguda, além de ser um importante patógeno veiculado por alimentos em todo o mundo (GOMES et al., 2015).

A salmonelose representa uma das principais zoonoses para a saúde pública em todo o mundo, devido às suas características de endemicidade, alta morbidade e, sobretudo, pela dificuldade da adoção de medida para o seu controle (EFSA, 2015). Quase 90.000 casos já foram confirmados na Europa e 1.049 surtos de salmonelose foram notificados em 2014 (NEITZKE; ROZA; WEBER, 2017). No Brasil, o patógeno foi considerado o segundo agente etiológico mais associado à DVA entre o período de 2009 a 2018, supõe-se que a ocorrência dessa bactéria seja decorrente das deficiências de saneamento básico e do precário controle de qualidade de algumas indústrias alimentícias (BRASIL, 2019).

Surtos de origem alimentar causados por especiarias contaminadas com *Salmonella* spp. foram registrados, em 2009 e 2010, nos Estados Unidos (CDC, 2010). Outro relato envolvendo contaminação por *Salmonella* spp. associado ao consumo de pimenta envolveu 85 casos confirmados nos Estados da Califórnia, Nevada, Oregon e Washington. Na Noruega, em 1981 e 1982, ocorreu um surto causado por *Salmonella* Oranienburg. Nesse caso da Noruega, a pimenta preta importada do Brasil foi considerada o principal produto responsável pelo surto (ZWEIFEL; STEPHAN, 2012).

Moreira et al. (2009) relataram a qualidade microbiológica de diversas especiarias comercializadas em São Paulo, com a identificação de *Salmonella* spp em 5,6% das amostras. Muitos trabalhos são desenvolvidos na investigação de especiarias contaminadas por *Salmonella* spp. e países como Brasil, Japão, Índia, Trinidad e Áustria apresentam resultados preocupantes (KNEIFEL; BERGER, 1994; FREIRE; OFFORD, 2002; BANERJEE; SARKAR, 2003; HARA-KUDO et al., 2006).

3.4 *Bacillus cereus*

Bacillus cereus são bastonetes Gram-positivos, aeróbios facultativos, móveis, formadores de esporos, que pertencem à família Bacillaceae. A ocorrência de *B. cereus* tem sido relatada em várias especiarias por ser comumente encontrado no solo (HARIRAM; LABBÉ, 2015).

São bactérias mesófilas, com crescimento ótimo de temperatura entre 28 °C a 35 °C, tolera uma ampla faixa de pH que varia de 4,9 a 9,3 e cresce em concentrações salinas de até 7,5% (BATISTA et al., 2018). Este microrganismo pode permanecer viável durante longos períodos de tempo no ambiente e nos alimentos, devido à sua capacidade de formar endósporos resistentes capazes de sobreviver a temperaturas normais de cozimento (HEINI et al., 2018).

B. cereus é um patógeno responsável por causar duas formas de DVA, a síndrome diarreica que está ligada a três enterotoxinas, Hbl, Nhe e CytK, cujos sintomas característicos são cólicas abdominais e diarreia aquosa ou profusa, com duração de seis a 15 horas e a síndrome emética, causada pela toxina cereulida, pré-formada em alimentos que se manifesta por meio de náuseas, vômitos e cólicas abdominais, podendo durar de 30 minutos a seis horas

(EHLING-SCHULZ; FRICKER; SCHERER, 2004; HEINI et al., 2018; NGUYEN; TALLENT, 2019).

O relatório de síntese da União Europeia sobre tendências e fontes de zoonoses, agentes zoonóticos e surtos de origem alimentar informou um total de 287 surtos causados por toxinas de *B. cereus* envolvendo 3.073 casos e 8% de hospitalização nos Estados membros da União Europeia em 2014, enquanto 291 surtos envolvendo 3.131 casos, com 3% de hospitalização foram notificados em 2015 (EFSA, 2016). No mesmo ano, quatro surtos foram relatados na Noruega e 15 na França (OSIMANI; AQUILANTI; CLEMENTI, 2018).

Lentz et al. (2018) relataram que 32,2% dos surtos de intoxicação alimentar no Sul do Brasil tiveram *B. cereus* como principal agente etiológico e a causa dos surtos foi associado à exposição dos alimentos a temperatura ambiente por mais de duas horas. *B. cereus* também tem sido relatado como contaminante comum em especiarias e na pesquisa de Frentzel et al. (2018) os resultados mostraram uma variação na contagem deste microrganismo de 8×10^1 UFC/g em manjericão, páprica e pimenta, a $1,6 \times 10^3$ UFC/g na pimenta-da-Jamaica.

4. RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

A Organização Mundial da Saúde define a resistência antimicrobiana como a capacidade de um microrganismo impedir que um agente antimicrobiano tenha ação contra ele, como resultado, os medicamentos se tornam ineficazes no tratamento de doenças infecciosas. Entre 2000 e 2010, o consumo de antimicrobianos em 71 países aumentou 36%, sendo o Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul os responsáveis por três quartos deste aumento (WHO, 2018).

A resistência aos antimicrobianos está aumentando em todo o mundo e atualmente é uma das maiores ameaças à saúde pública, o que tem provocado uma elevação na morbidade e mortalidade (FANG et al., 2019). Dados estatísticos relatam que há cerca de 700.000 mortes, a cada ano, devido à resistência bacteriana e se a tendência continuar, até 2050 se tornará a principal causa de morte (GHOSH, 2019).

Os antimicrobianos são substâncias naturais ou sintéticas que são capazes de inibir processos vitais de uma ou mais espécies de microrganismos, visando a

eliminação ou impedimento do crescimento de um agente infeccioso. Estes antimicrobianos têm sido rotineiramente usados para terapia, profilaxia e promoção do crescimento em animais há várias décadas (FERREIRA; FERREIRA, 2015).

A introdução de fármacos permitiu melhora significativa no tratamento médico das doenças infecciosas ocasionando uma considerável redução das taxas de mortalidade (COSTA; SILVA JUNIOR, 2017). Entretanto, o uso excessivo e/ou inadequado de antimicrobianos ocasiona seleção de microrganismos resistentes. Este processo de pressão seletiva dá origem ao termo resistência antimicrobiana, a qual compromete a efetividade desses fármacos inviabilizando o tratamento de infecções (ECONOMOU; GOUSIA, 2015).

Algumas espécies bacterianas são consideradas naturalmente resistentes a agentes antimicrobianos como resultado de uma característica estrutural ou funcional inerente de uma espécie que, normalmente, ocorre devido ao fato delas não possuírem o alvo molecular para ação do fármaco ou então é impermeável a ele (BLAIR et al., 2015). Por outro lado, a resistência adquirida ocorre através de mutações em genes cromossômicos ou por transferência horizontal de genes, transportados por elementos móveis, tais como os plasmídeos, transposons e integrons (KOHL; PONTAROLO; PEDRASSANI, 2016). Esta transferência de genes ocorre por processos de transdução, conjugação e transformação (SEMRET; HARAQUI, 2019).

No estudo de Faúla, Cerqueira e Magalhães (2017) foram isoladas 220 cepas de *E. coli*, em diferentes alimentos, incluindo as especiarias. Os resultados mostraram que 19,1% das cepas apresentaram resistência a pelo menos um dos fármacos testados. Os autores enfatizaram o agravo à Saúde Pública devido à limitação terapêutica associada aos microrganismos resistentes.

4.1 Mecanismos de ação dos antimicrobianos

Os antimicrobianos utilizados para o tratamento de infecções bacterianas são classificados de acordo com o principal mecanismo de ação, dentre eles, se destacam a inibição da síntese da parede celular, inibição da síntese de

proteínas, desestabilização da membrana da célula bacteriana, interferência na síntese de ácido nucleico e inibição da síntese de folato (NOGUEIRA et al., 2016).

Os β -lactâmicos constituem a principal classe de antimicrobianos que agem inibindo a síntese da parede celular, sendo os mais utilizados na prática clínica (BERTONCHELI; HORNER, 2008). Os β -lactâmicos atuam inibindo a enzima transpetidase, necessária para a síntese da camada de peptidoglicano. Esta classe de medicamentos é constituída pelas penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos que possuem em comum um elemento estrutural, o anel β -lactâmico, o qual lhe confere atividade bactericida (NOGUEIRA et al., 2016).

Os inibidores da síntese proteica exercem efeito sobre os ribossomos bacterianos e possuem como representantes os aminoglicosídeos, cloranfenicol, tetraciclina e macrolídeos (TENOVER, 2006). Os aminoglicosídeos apresentam efeito bactericida por ligarem-se especificamente à subunidade 30S dos ribossomos bacterianos, impedindo o movimento do ribossomo ao longo do mRNA e, conseqüentemente, interrompendo a síntese de proteínas. O cloranfenicol se liga à mesma região que os macrolídeos e parece inibir o movimento dos ribossomos pela inibição da peptidil transferase, responsável pela extensão da cadeia peptídica (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010). Enquanto as tetraciclina impedem a ligação do aminoacil-tRNA e como resultado, a adição de novos aminoácidos para o aumento da cadeia proteica é bloqueada. Os macrolídeos atuam ligando-se a receptores da subunidade 50S do ribossomo, impedindo as reações de transpeptidação e translocação (SANTOS et al., 2018).

Outros grupos farmacológicos de antimicrobianos, como as polimixinas e daptomicinas, atuam desestabilizando a membrana citoplasmática. As polimixinas interagem com os lipopolissacarídeos (LPS) da membrana externa das bactérias Gram-negativas, removendo as moléculas de cálcio e magnésio necessários para a estabilidade da membrana. Deste modo, a desestabilização promove o aumento da permeabilidade levando a morte celular bacteriana (GIRARDELLO; GALES, 2012; KAYE et al., 2016). Já o mecanismo de ação das daptomicinas, consiste na ligação da droga à membrana celular bacteriana levando à rápida despolarização do potencial de membrana, o que determina a inibição da síntese de proteínas,

DNA e RNA, além do extravasamento de conteúdo citoplasmático e morte bacteriana (SANTOS et al., 2018).

As quinolonas e fluoroquinolonas representam uma classe de fármacos sintéticos, quimicamente semelhantes, que interferem na síntese dos ácidos nucleicos ao inibirem as enzimas bacterianas DNA-girase e topoisomerase IV que tornam a molécula de DNA biologicamente ativa (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010). Por outro lado, existem também diversas espécies de bactérias que necessitam sintetizar folatos, uma vez que são impermeáveis a estes compostos, e, portanto, não conseguem captá-los do meio externo. Os derivados dos folatos desempenham a função de cofatores essenciais às enzimas, que atuam na síntese de purinas, pirimidinas, aminoácidos e timidinas. As sulfonamidas constituem a classe de antimicrobianos que atuam inibindo a síntese de folato (BLAIR et al., 2015).

Os principais antimicrobianos utilizados para as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bem como seus respectivos mecanismos de ação, estão listados na Tabela 1.

Tabela 1. Mecanismo de ação das principais classes de antimicrobianos.

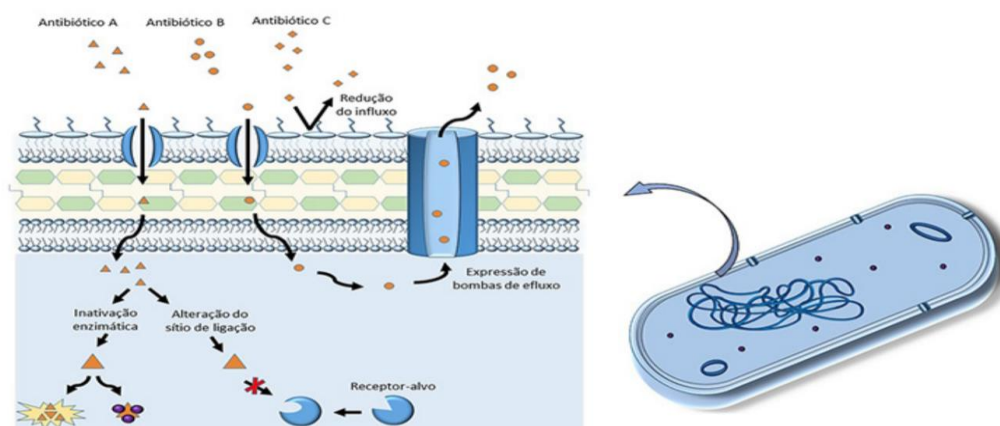
Classes	Antimicrobianos	Mecanismo de ação
β -lactâmicos	Penicilina Ceftazidima Oxacilina Ceftriaxona Imipenem Ampicilina Aztreonam Cefepime	Inibição da parede celular
Quinolonas	Ácido nalidíxico	Inibição da síntese de ácido nucléico
Fluorquinolonas	Ciprofloxacina	Inibição da síntese de ácido nucléico
Sulfonamidas	Sulfazotrim	Inibição da síntese de folato
Tetraciclina	Tetraciclina	Inibição da síntese de proteínas
Cloranfenicol	Cloranfenicol	Inibição da síntese de proteínas
Macrolídeos	Eritromicina	Inibição da síntese de proteínas
Aminoglicosídeos	Gentamicina Amicacina	Inibição da síntese de proteínas

Lincosamidas	Clindamicina	Inibição da síntese de proteínas
Nitrofurânicos	Nitrofurantoína	Inibição da síntese de proteínas

4.2 Mecanismos de resistência microbiana

As bactérias são capazes de desenvolver resistência aos antimicrobianos utilizando diversos mecanismos, dentre os quais se destacam a inativação enzimática do antimicrobiano, bombas de efluxo, mudança no sítio de ligação do antimicrobiano e alterações na permeabilidade da parede ou membrana celular (Figura 1) (KOHL; PONTAROLO; PEDRASSANI, 2016; NOGUEIRA et al., 2016).

Figura1. Mecanismos de resistência aos antimicrobianos. Fonte: NOGUEIRA et al. (2016)



O mecanismo de resistência bacteriano mais importante e muito frequente é a degradação do antimicrobiano por enzimas, como as β -lactamases, que atuam inibindo a ação das drogas antibacterianas (BERTONCHELI; HORNER, 2008). A produção de β -lactamases constitui o principal mecanismo de resistência das bactérias Gram-negativas aos antimicrobianos β -lactâmicos. Estas enzimas originam resistência aos fármacos ao clivarem a estrutura do anel β -lactâmico e desativam a propriedade antibacteriana da molécula (CORNAGLIA; GIAMARELLOU; ROSSOLINI, 2011).

Outro mecanismo de resistência são as bombas de efluxo, proteínas presentes na membrana bacteriana que são consideradas os principais contribuintes para a resistência intrínseca das bactérias Gram-negativas. Nesse

tipo de resistência ocorre um efluxo que consiste no bombeamento ativo de antimicrobianos do meio intracelular para o extracelular (NIKAIDO; PAGÈS, 2012).

Os antimicrobianos, em sua maioria, possuem alta afinidade e especificidade aos seus sítios de ligação na célula bacteriana, fator essencial para atingir o efeito desejado, no entanto, alterações na estrutura alvo dos antimicrobianos afetam a eficácia do fármaco (WILSON, 2014). Um exemplo muito preocupante é a resistência de bactérias Gram-negativas ao antimicrobiano polimixina, que é conferida pela modificação da estrutura dos lipopolissacarídeos (LPS) da membrana bacteriana. Nos LPS de bactérias resistentes, os lipídios A possuem grupos fosfatos modificados, que alteram a afinidade das polimixinas aos LPS (NOGUEIRA, et al. 2016).

A permeabilidade do fármaco sobre a membrana bacteriana é essencial para que este possa exercer o efeito bacteriostático ou bactericida. Esta alteração constitui um dos mecanismos de resistência à entrada de substâncias tóxicas para o meio intracelular (CAUMO et al., 2010). As bactérias Gram-negativas são naturalmente menos permeáveis a muitos antimicrobianos devido à presença da proteção adicional proporcionada pela membrana externa. Essa membrana desempenha o papel de barreira física para a entrada de moléculas no interior da célula, podendo limitar a entrada do fármaco. Enquanto, em bactérias Gram-positivas, a ausência da membrana externa contribui para a sensibilidade a muitos antimicrobianos (EPAND, 2015).

5. TECNOLOGIAS DE CONSERVAÇÃO EM ESPECIARIAS

As técnicas de conservação têm sido aplicadas à tecnologia de processamento para reduzir a contaminação microbiana de especiarias e para estender a vida útil desses produtos alimentícios. As atuais técnicas de processamento da indústria de especiarias incluem tratamento com vapor, irradiação e fumigação com óxido de etileno (EL-SAYED; YOUSSEF, 2019).

A aplicação de vapor a alta temperatura é eficaz na redução de patógenos, mas existem algumas desvantagens em utilizar o vapor nas especiarias, dentre elas a perda das propriedades sensoriais e a mudança de cor. Além disso, o maior teor de umidade após o tratamento com vapor é propício para o

crescimento de fungos (CHEON et al., 2015). Devido ao seu potencial carcinogênico para humanos, o uso de óxido de etileno é proibido na União Europeia. Atualmente, a fumigação com o óxido de etileno é utilizada nas especiarias potencialmente contaminadas por bactérias patogênicas, como *Salmonella* spp. (GOLDEN et al., 2019). Esta fumigação é particularmente importante na esterilização de algumas especiarias que não podem ser submetidas a outros cozimentos antes de serem consumidas (FOWLES; MITCHELL; MCGRATH, 2001).

Outro tratamento aplicado em especiarias é a irradiação, incluindo a aplicação de raios gama, raios-X e exposição a feixes de elétrons. Esta técnica tem se mostrado um método eficaz na inativação de patógenos (SCHWEIGGERT; CARLE; SCHIEBER, 2007). A irradiação gama está autorizada na UE para ser utilizada na descontaminação de especiarias secas com uma dose média máxima de 10 kGy, embora as propriedades sensoriais e antioxidantes do produto possam ser levemente afetadas (MOLNÁR et al., 2018).

Atualmente, técnicas inovadoras como o uso de revestimentos edíveis têm sido utilizadas no processamento de especiarias devido a sua alta qualidade, fácil aplicação e segurança microbiológica. Os revestimentos edíveis são muito promissores e é uma das tecnologias mais investigadas para a qualidade dos produtos alimentícios para o aumento da vida de prateleira (ARNON-RIPS; POVERENOV, 2018).

5.1 Revestimento edível

Os revestimentos edíveis são definidos como camadas finas de material comestível aplicado à superfície de produtos alimentícios reduzindo danos mecânicos e microbianos (GALUS; KADZIŃSKA, 2015). O revestimento pode ser aplicado por imersão do produto, permitindo que o excesso seja drenado à medida que seca e se solidifica ou também pode ser aplicado por meio da pulverização para criar uma atmosfera modificada (ARNON-RIPS; POVERENOV, 2018).

O revestimento edível deve atender alguns requisitos como reduzir a permeabilidade ao vapor de água, melhorar a aparência e as propriedades de manuseio mecânico, manter a integridade estrutural, transportar agentes ativos

(antioxidantes, vitaminas, etc.), reter compostos de sabor voláteis, ser pegajoso, ter um desempenho de secagem eficiente e uma baixa viscosidade, além de ser econômico (DHALL, 2013).

O revestimento é sintetizado a partir de substâncias com propriedades de formação de película. Ele pode ser formulado a partir de diferentes materiais como proteínas, lipídios ou polissacarídeos, que tem como principal vantagem a sua biodegradabilidade (FALGUERA et al., 2011). Além destas substâncias utilizadas no revestimento também é necessária a adição de plastificantes como, por exemplo, glicerol, sorbitol, monoglicerídeos, polietilenoglicol e glicose, que são frequentemente usados para aumentar a flexibilidade e a elasticidade de materiais de base biológica (GALUS; KADZIŃSKA, 2015).

Revestimentos à base de proteínas geralmente apresentam alta permeabilidade a gases, boas propriedades mecânicas e barreiras de baixa umidade. Proteínas com baixa solubilidade em água geralmente são menos permeáveis aos vapores. Por outro lado, as proteínas têm uma probabilidade substancial de causar reações alergênicas que limitam seu uso (ARNON-RIPS; POVERENOV, 2018). Dentre as proteínas frequentemente usadas se destaca o colágeno, gelatina, caseína, proteína de soro de leite, zeína de milho, glúten de trigo, proteína de soja, proteína de clara de ovo, proteína miofibrilar, proteína quinoa e a queratina (HASSAN et al., 2018).

Os lipídeos mais utilizados em revestimentos são as ceras de origem animal e vegetal, os óleos vegetais e os ácidos graxos. Os revestimentos à base de lipídios são considerados altamente eficazes para bloquear a liberação de umidade devido à sua baixa polaridade (ARNON-RIPS; POVERENOV, 2018). Normalmente, os revestimentos feitos de lipídios são extremamente frágeis e espessos devido à hidrofobicidade. Com o aumento na concentração da fase de hidrofobicidade, a permeabilidade ao vapor de água diminui. No entanto, foi relatado que lipídios contendo revestimentos podem danificar a aparência e brilho dos produtos alimentícios revestidos (HASSAN et al., 2018).

Os principais polissacarídeos utilizados na aplicação de revestimentos são amido, pectina, quitosana, alginato e carragenina (TRINETTA, 2016). Devido à natureza hidrofílica, os revestimentos à base de polissacarídeos podem fornecer apenas uma barreira mínima à umidade. No entanto, as propriedades de barreira aos gases modificam desejavelmente a atmosfera e aumentam o prazo de

validade sem a criação de condições anaeróbicas severas. Os revestimentos de polissacarídeos podem incluir várias gomas naturais de diferentes fontes, amidos, dextrina, pectina, celulose e seus derivados, quitosana, alginato, carragenina, gelano e outros (YOUSUF; QADRI; SRIVASTAVA, 2018).

Os revestimentos de polissacarídeos são incolores, têm aparência livre de oleosidade e um teor calórico menor e podem ser aplicados para prolongar a vida de prateleira de frutas, vegetais, mariscos ou produtos cárneos, reduzindo significativamente a desidratação, escurecimento da superfície e rancidez oxidativa (HASSAN et al., 2018). Dentre os polissacarídeos, se destaca o alginato de sódio como um biopolímero eficaz no revestimento devido às suas características coloidais distintas, tais como espessamento, formação de gel, formador de filme e agente estabilizador de emulsão (DHALL, 2013).

Alginatos são polissacarídeos adquiridos de algas marinhas marrons. São compostos de β -D-manurônico (M) e ácido α -1-gulurônico (G) em vários graus, arranjos e peso molecular. A formação de alginato ocorre quando íons multivalentes ou divalentes geralmente (Ca^{2+}) interagem ionicamente com blocos de resíduos de ácido gulurônico de duas cadeias diferentes, resultando em uma rede tridimensional (DHALL, 2013).

As características físicas dos géis de alginato são amplamente dependentes de sua composição química, ou seja, a proporção de resíduos ácidos gulurônicos (G) a manurônicos (M), a ordem sucessiva dos resíduos, o comprimento dos blocos-G e o peso molecular total dos mesmos. Outras propriedades importantes dos alginatos são o seu carácter espessante (aumento da viscosidade do dissolvente após a dissolução) e as propriedades de permuta iônica (HASSAN et al., 2018). No entanto, o alginato de sódio não possui propriedades antimicrobianas ou antioxidantes quando usado como revestimento. Portanto, a associação de compostos antimicrobianos naturais ao alginato para aplicação no revestimento edível fornece uma maneira viável de prolongar a vida útil de armazenamento de frutas e vegetais (LI et al., 2019).

Os antimicrobianos naturais são reconhecidos como substâncias que ocorrem naturalmente e que são derivados de sistemas biológicos sem alteração em um ambiente de laboratório. Estes podem ser obtidos de diferentes fontes, incluindo plantas, animais, bactérias, algas e fungos (MARTÍNEZ-GRACIÁ et al., 2015).

Os antimicrobianos naturais têm atraído à atenção dos pesquisadores em virtude do seu grande potencial na segurança alimentar visto que os compostos derivados de fontes naturais têm propriedades que atuam contra patógenos veiculados por alimentos (GYAWALI; IBRAHIM, 2014). Nesse sentido, o uso de antimicrobianos naturais na conservação de alimentos proporciona inúmeros benefícios, dentre eles, o controle da contaminação microbiana nos alimentos, redução de patógenos resistentes a antimicrobianos, além de ser uma boa alternativa para substituir os conservantes alimentares sintéticos (PISOSCHI et al., 2018).

Diante desse contexto, pode-se destacar o uso de própolis como antimicrobiano natural que tem ganhado atenção na indústria alimentícia em virtude dos compostos bioativos que determinam sua aplicação na tecnologia de alimentos (POBIEGA et al., 2019).

5. 2 Própolis

A palavra própolis é derivada do grego "pro" (em defesa de) e "polis" (cidade), que significa substância defensiva da cidade (ou da colmeia) (GHISALBERTI, 1979). A própolis é uma substância resinosa de diversas cores (verde, vermelha, amarela e marrom) coletada por abelhas *Apis mellifera* a partir de brotos e exsudatos de plantas em diferentes regiões do mundo. Esses brotos e exsudatos são misturados com cera, pólen e enzimas salivares, β -glicosidase, que são adicionadas para formar o produto final (MARCUCCI, 1995).

A composição da própolis depende principalmente da fonte vegetal utilizada pelas abelhas para coletar as resinas ou exsudatos (HERRERA-LÓPEZ et al., 2019). Essa composição é inconstante e muda a depender da região geográfica, clima, condições ambientais e épocas de coleta (KUJUMGIEV et al., 1999; BANKOVA et al., 2016). Mais de 420 compostos químicos já foram identificados em amostras de própolis provenientes de várias regiões geográficas do mundo (POBIEGA et al., 2019).

Os principais componentes da própolis incluem flavonóides (tectoquyrina, pinobanksina, pinocembrina, crisina, quercetina, galangina, apigenina, kaempferol), ácidos aromáticos (ácido cinâmico, cafeico, ferúlico e cumárico), terpenóides (geraniol, farnesol, estireno), aldeídos aromáticos (vanilina),

hidrocarbonetos (eicosane, tricosane, pentacosane), esteróides (stigmasterol, calinasterol, fucosterol), enzimas (α -amilase, β -amilase), micro e macronutrientes (Ca, K, Mg, Na, Zn, Fe, Mn, Al, Ba, Cl), vitaminas (A, B₁, B₂, B₆, C, E), e óleos essenciais, que são representados principalmente por monoterpenos e sesquiterpenos (KUBILIENE et al., 2015; POBIEGA et al., 2019).

Dentre os componentes da própolis se destacam os flavonoides e ácidos fenólicos em virtude de grande parte das atividades biológicas descritas serem atribuídas a esses compostos (TORLAK; SERT, 2013). Segundo Anjum et al. (2018) a atividade antibacteriana da própolis é atribuída aos compostos ativos, como os compostos aromáticos (ácido cafeico) e flavonoides. Os autores ainda afirmam que os componentes da própolis, como a pinocembrina apresenta uma intensa atividade antibacteriana frente ao *Streptococcus* sp., enquanto que o ácido p-cumárico, o artemillin C e o ácido 3-fenil-4-dihidrocinaminocinâmico são eficazes contra o *Helicobacter pylori*.

A atividade antibacteriana da própolis pode ser explicada pela alteração da permeabilidade da membrana, pela capacidade de destruir a parede celular e o citoplasma bacteriano, inibir a síntese proteica, bem como impedir a divisão celular. Estes mecanismos são decorrentes da atividade sinérgica dos muitos compostos presentes na própolis (ANDRADE et al., 2018; ANJUM et al., 2018).

Diversos trabalhos têm relatado ações antibacterianas da própolis. Nos estudos de Al-Waili et al. (2012) foi relatado o efeito do extrato de própolis frente as bactérias *Enterococcus* spp., *E. coli* e *S. aureus*. Já na pesquisa de Fokt et al. (2010), a própolis apresentou atividade antibacteriana para as bactérias aeróbias como *B. cereus*, *B. subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Nocardia asteroides*, *Staphylococcus auricularis*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. warnerii*, *S. mutans*, *S. hominis*, *Streptococcus cricetus*, *St. faecalis*, *St. pyogenes*, *St. pneumoniae*, *St. Sobrinus* e *St. viridians*.

A composição química desse produto apícola, particularmente, a riqueza de compostos bioativos, determina sua aplicação na produção de alimentos (SILICI; KARAMAN, 2014). Nesse sentido, a adição de própolis aos alimentos garante inúmeros benefícios como, propriedades antimicrobianas, antifúngicas, antioxidantes e anti-inflamatórias, além de garantir a estabilidade microbiana e a qualidade dos alimentos durante o armazenamento (VIERA et al., 2016; SFORCIN; BANKOVA; KUROPATNICKI, 2017).

O uso de própolis como conservante natural em alimentos foi relatado por Yang et al (2017) ao adicionarem 0,2 mg/mL de própolis ao suco de laranja e verificarem uma redução significativa na contagem de esporos de bactérias. Segundo os autores a própolis pode ser utilizada como agente aditivo natural em suco de laranja ou outros sucos de frutas como alternativa aos conservantes químicos.

Outra aplicação da própolis que tem ganhado cada vez mais importância na indústria alimentar é o revestimento edível que fornece uma resposta aos desafios relacionados ao armazenamento dos produtos alimentares e surge como uma alternativa para reduzir a contaminação microbiana causada pelo processamento de alimentos (ALI; WEI; MUSTAFA, 2015). Diante disso, uma alternativa para a proteção da superfície dos alimentos pode ser realizada por meio da imersão do alimento por alguns minutos em soluções de extrato de própolis ou pulverização da superfície do alimento com a finalidade de reduzir ou eliminar completamente patógenos que são veiculados através dos alimentos (POBIEGA et al., 2019).

Nos estudos de Hassanin e El-Daly (2013) foi verificado a redução de bactérias totais e psicrófilas em filés de tilápia do Nilo revestido com extrato de própolis a 0,06%. Enquanto Sagdic, Silici e Yetim (2007) adicionaram 2% e 5% de extrato de própolis em suco de maçã e verificaram que nessas concentrações o extrato apresentou atividade antimicrobiana frente *E. coli* O157:H7. Para os autores faz-se necessário a realização de mais pesquisas com o extrato de própolis por ser promissor na conservação de alimentos.

Embora diversos estudos tenham sido realizados com o objetivo de investigar o efeito da própolis em diversos alimentos como sucos de frutas, vegetais, ovos, carne e produtos derivados de peixe (BANKOVA; POPOVA; TRUSHEVA, 2016), as aplicações do extrato de própolis na pimenta-do-reino para o controle do crescimento microbiano e conservação durante a vida útil ainda não foram descritos.

REFERÊNCIAS

- ALCÂNTARA, G. L. C.; KATO, H. C. A. Good handling practices of fresh shrimp sold in street fairs of Belém, PA, Brazil. **Journal of Bioenergy and Food Science**, v. 3, n. 3, p. 139-148, 2016.
- ALI, A.; WEI, Y. Z.; MUSTAFA, M. A. Exploiting propolis as an antimicrobial edible coating to control post-harvest anthracnose of bell pepper. **Packaging Technology and Science**, v. 28, n. 2, p. 173-179, 2015.
- ALMEIDA, M. S. C.; MENDONÇA, R. L.; FREITAS, M. Z. C.; VANDESMET, L. C. *Staphylococcus aureus*. **Mostra Científica em Biomedicina**, v. 1, n. 1, p.1-7 2016.
- AL-WAILI, N. A.; AL-GHAMDI, A.; ANSARI, M. J.; AL-ATTAL, Y.; SALOM, K. Synergistic effects of honey and propolis toward drug multi-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* isolates in single and polymicrobial cultures. **International Journal of Medical Sciences**, v. 9, n. 9, p. 793-800, 2012.
- ARNON-RIPS, H.; POVERENOV, E. Improving food products' quality and storability by using Layer by Layer edible coatings. **Trends In Food Science & Technology**, v. 75, p. 81-92, 2018.
- ARGUDÍN, M. A.; MENDOZA, M. C.; GONZÁLEZ-HEVIA, M. A.; BANCES, M.; GUERRA, B.; RODICIO, M. R. Genotypes, exotoxin gene content, and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* strains recovered from foods and food handlers. **American Society for Microbiology**, v. 78, n. 8, p. 2930-2935, 2012.
- ATNAFIE, D. P.; ABERA, B. M.; TEFERA, G.; HAILU, D.; KASAYE, S.; AMENU, K. Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle feces and contamination of carcass and various contact surfaces in abattoir and butcher shops of Hawassa, Ethiopia. **BMC Microbiology**, v.17, n. 24, p. 1-7, 2017.
- ANDRADE, J. K. S.; GEORGE, M. D.; ANDRADE, R. S.; NASCIMENTO, C. C.; BARBOSA, P. F.; JESUS, M. S.; NARAIN, N. Development and characterization of microencapsules containing spray dried powder obtained from Brazilian brown, green and red propolis. **Food Research International**, v. 109, p. 278-287, 2018.
- ANJUM, S.I.; ULLAH, A.; KHAN, A. ATTAULLAH, M.; AMJAD-BASHIR, M.; TAHIR, M.; ANSARI, M.; GHAMH, H. A.; ADGABA, N.; TRAÇO, W. K. Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. **Saudi Journal of Biological Sciences**, p. 200-234, 2018.
- BANERJEE, M.; SARKAR, P. K. Microbiological quality of some retail spices in India. **Food Research International**, v. 36, n. 5, p. 469-474, 2003.

BANKOVA, V., POPOVA, M., TRUSHEVA, B. New emerging fields of application of propolis. **Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering**, v. 35, n.1, p. 1-11, 2016.

BATISTA, R. D.; PEREIRA, C. F.; OLIVEIRA, A. I. T.; SILVA, J. F. M. Contaminação por *Bacillus cereus* e os riscos gerados através da intoxicação. **Revista Desafios**, v. 5, n. 2, p. 1-11, 2018.

BERTONCHELI, C. M.; HORNER, R. Uma revisão sobre metalo- β -lactamases. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 4, p. 577-599, 2008.

BUTT, M. S.; PASHA, I.; SULTAN, M. T.; RANDHAWA, M. A.; SAEED, F.; AHMED, W. Black pepper and health claims: A comprehensive treatise. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 53, n. 9, p. 875-886, 2013.

BLAIR, J. M.; WEBBER, M. A.; BAYLAY, A. J.; OGBOLU, D. O; PIDDOCK, L. J. Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n.1, p. 42-51, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 de janeiro de 2001. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=144>>. Acesso: 19 dez 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 276, de 22 de setembro de 2005. **Regulamento técnico para especiarias, temperos e molhos**. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=1883>. Acesso em: 26. jan. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Surtos Alimentares no Brasil – Dados atualizados em maio de 2017**. Disponível em: < <https://foodsafetybrazil.org/surtos-alimentares-no-brasil-dados-atualizados-em-maio-de-2017/>. Acesso em: 13. fev. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde-MS. **Surtos de Doenças transmitidas por alimentos no Brasil- Junho de 2018**. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/julho/02/Apresentacao-Surtos-DTA-Junho-2018.pdf>. Acesso em: 12. fev. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Surtos Alimentares no Brasil – Dados Atualizados em Fevereiro de 2019**. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/fevereiro/15/Apresenta----o-Surtos-DTA-Fevereiro-2019.pdf>. Acesso em: 22. dez. 2018.

BRACHT, F.; CONCEIÇÃO, G. C.; SANTOS, C. F. M. A América conquista o mundo: uma história da disseminação das especiarias americanas a partir das viagens marítimas do século XVI. **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos**, v. 2, n. 1, p.11-16, 2011.

CAC. **Code of hygienic practice for spices and dried aromatic plants (CAC/RCP42-1995)**. (1995). Disponível em: <http://www.greenfoodec.eu/documents/codeofhygienicpracticeforspicesanddriedaromaticplants.pdf>. Acesso em: 28 de jan. 2019.

CANIÇA, M.; MANAGEIRO, V.; ABRIOUEL, H.; MORAN-GILAD, J.; FRANZ, C. M. A. Antibiotic resistance in foodborne bacteria. **Trends In Food Science & Technology**, v. 84, p. 41-44, 2019.

CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C.; CASTRO, A. G. M; KANASHIRO, A. M. I.; GAMA, N. M. S. Q. Pesquisa de coliformes totais e coliformes fecais analisados em ovos comerciais no laboratório de patologia avícola de descavado. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 68, n. 1, p.19-22, 2001.

CARDOSO, A. L. S.; TESSARI, E. N. C. *Salmonella* enteritidis em aves e na saúde pública: revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 11, n. 21, 2013.

CAUMO, K.; DUARTE, M.; CARGNIN, S.T.; RIBEIRO, V. B.; TASCA, T.; MACEDO, A. J. Resistência bacteriana no meio ambiente e implicações na clínica hospitalar. **Revista Liberato**, v. 11, n. 16, p. 89-188, 2010.

CAVALCANTE, P. S; FERREIRA, J. H; NETO, A. C. N; Pesquisa de bactérias coliformes totais e termotolerantes no córrego ouro preto do município de Ouro Preto do Oeste/RO. **Revista Saberes UNIJIPA**, v. 8, n. 1, p. 99-108, 2018.

CDC. Centro de Controle e Prevenção de Doenças: **atualização de infecções de Salmonella Montevidéu em humanos, 2010**. Disponível em: <http://www.cdc.gov/salmonella/montevideo/index.html>. Acesso em: 12. fev. 2019.

CHEN, Y.; ZHOU, Y.; ZHEN, S.; ZHANG, R.; CHEN, J.; LIU, Z.; CHENG, H.; DUAN, S.; LAN, Z.; SUN, J.; YOU, X.; LI, J.; WU, Y. Burden of self-reported acute gastrointestinal illness in China: A population-based survey. **BMC Public Health**, v.13, n.1 p. 456, 2013.

CHEON, H.; SHIN, J.; PARK, K.; CHUNG, M.; KANG, D. Inactivation of foodborne pathogens in powdered red pepper (*Capsicum annuum* L.) using combined UV-C irradiation and mild heat treatment. **Food Control**, v. 50, p. 441-445, 2015.

CORNAGLIA, G.; GIAMARELLOU, H.; ROSSOLINI, G. M. Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams?. **Lancet Infectious Diseases**, v. 11, n. 5, p. 381-393, 2011.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. Code of hygienic practice for spices and dried aromatic herbs. **International Food Standards**, p. 16, 2014. Disponível em: <http://www.esac.pt/noronha/manuais/Codex>. Acesso em 10. fev. 2019.

CUNHA, M.; MARTINS, R.; ANDRÉ, S.; ALBUQUERQUE, C.; CUNHA, B.; ALMEIDA, D.; SILVA, D. M.; GASPAR, R.; FONSECA, S. Consumo de sal,

açúcar, ervas, plantas aromáticas e especiarias. **Revista Servir**, v. 59. n. 4, p. 36-41, 2016.

CLEMENTS, A.; YOUNG, J. C.; CONSTANTINOU, N.; FRANKEL, G. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Gut Microbes**, v. 3, n. 2, p. 71-87, 2012.

COSTA, A. L. P.; SILVA JUNIOR, A. C. S. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública : uma breve revisão de literatura. **Estação Científica - UNIFAP**, v. 7, n. 2, p. 45-57, 2017.

DHALL, R. K. Advances in Edible Coatings for Fresh Fruits and Vegetables: A Review. **Critical Reviews In Food Science And Nutrition**, v. 53, n. 5, p. 435-450, 2013.

EC. EUROPEAN COMMISSION. **Commission recommendation of 19 December 2003 concerning a coordinated programme for the official control of food stuffs for 2004**. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/GA/TXT/?uri=CELEX:32004H0024>. Acesso em: 18. fev. 2019.

ECONOMOU, V.; GOUSIA, P. Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. **Infection and Drug Resistance**, v. 8, p. 49-61, 2015.

EFSA. European Food Safety Authority. O relatório de síntese da União Europeia sobre as tendências e fontes de zoonoses, agentes zoonóticos e surtos de origem alimentar em 2015. **EFSA Journal**, v. 14, n. 12, p. 231, 2016.

EFSA. European Food Safety Authority. O relatório de síntese da União Europeia sobre as tendências e fontes de zoonoses, agentes zoonóticos e surtos de origem alimentar em 2014. **EFSA Journal**, v. 13, p. 4329, 2015.

EHLING-SCHULZ, M.; FRICKER, M.; SCHERER, S. *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 48. n. 7, p. 479-487, 2004.

EL-SAYED, S. M.; YOUSSEF, A. M. Potential application of herbs and spices and their effects in functional dairy products. **Heliyon**, v. 5, n. 6, p.1-2, 2019.

EPAND, R. M.; WALKER, C.; EPAND, R. F.; MAGARVEY, N. A. Molecular mechanisms of membrane targeting antibiotics. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1858, n. 5, p. 980-987, 2016.

EVANGELISTA-BARRETO, N. S.; SAMPAIO, A. P.; SILVA, R. A. R.; SARAIVA, M. A. F.; SILVA, I. P. Veiculação de enterobactérias resistentes aos antimicrobianos em frutos do mar. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, v. 10, n. 2, 2017.

FALGUERA, V.; QUINTERO, J. P.; JIMÉNEZ, A.; MUÑOZ, J. A.; IBARZ, A. Edible films and coatings: Structures, active functions and trends in their use. **Trends In Food Science & Technology**, v. 22, n. 6, p. 292-303, jun. 2011.

FANG, J.; SHEN, Y.; QU, D.; HAN, J. Antimicrobial resistance profiles and characteristics of integrons in *Escherichia coli* strains isolated from a large-scale centralized swine slaughterhouse and its downstream markets in Zhejiang, China. **Food Control**, v. 95, p. 215-222, 2019.

FAO. Food and Agriculture Organization of The United Nations. **Codex committee on spices and culinary herb**. India, 2014. Disponível em: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius>. Acesso em: 16. fev. 2019.

FAOSTAT. Statistics Division of Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Production Quantities of Spices**. 2017. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>. Acesso em: 5. fev. 2019.

FAÚLA, L. L.; CERQUEIRA, M. M. O.; MAGALHÃES, P. P. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana e identificação de patótipos diarreogênicos entre amostras de *Escherichia coli* isoladas de alimentos. **Revista Brasileira Ciência Veterinária**, v. 24, n. 1, p. 108-115, 2017.

FEITOSA, A. C.; RODRIGUES, R. M.; TORRES, E. A.; SILVA, J. F. M. *Staphylococcus aureus* em alimentos. **Revista Desafios**, v. 4, n. 04, 2017.

FERREIRA, T. A.; FERREIRA, F. D. Qualidade da prescrição de antimicrobianos comercializados na região noroeste do Paraná, Brasil. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 10, n. 1, p. 131-137, 2015.

FLEUROT, I.; AIGLE, M.; FLEUROT, R.; DARRIGO, C.; HENNEKINNE, J.; GRUSS, A.; BOREZÉE-DURANT, E.; DELACROIX-BUCHETA, A. Following Pathogen Development and Gene Expression in a Food Ecosystem: the Case of a *Staphylococcus aureus* Isolate in Cheese. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 16, p. 5106-5115, 2014.

FOGELE, B.; GRANTA, R.; VALCIN, O.; BERZIN, A. Occurrence and diversity of *Bacillus cereus* and moulds in spices and herbs. **Food Control**, v. 83, p.69-74, 2018.

FOKT, H.; PEREIRA, A.; FERREIRA, A. M.; CUNHA, A.; AGUIAR, C. How do bees prevent hive infections? The antimicrobial properties of propolis. **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, v.1, p. 481-493, 2010.

FOWLES, J.; MITCHELL, J.; MCGRATH, H.. Assessment of cancer risk from ethylene oxide residues in spices imported into New Zealand. **Food And Chemical Toxicology**, v. 39, n. 11, p. 1055-1062, 2001.

FREEDMAN, P. Health, wellness and the allure of spices in the middle ages. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 167, p. 47-53, 2015.

FREIRE, F. C; OFFORD, L. Bacterial and yeast counts in Brazilian commodities and spices. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 2, p. 145-148, 2002.

FRENTZEL, H.; KRAUSHAAR, B.; KRAUSE, G.; BODI, D.; WICHMANN-SCHAUER, H.; APPEL, B.; MADER, A. Phylogenetic and toxinogenic characteristics of *Bacillus cereus* group members isolated from spices and herbs. **Food Control**, v. 83, p. 90-98, 2018.

GALUS, S.; KADZIŃSKA, J. Food applications of emulsion-based edible films and coatings. **Trends In Food Science & Technology**, v. 45, n. 2, p. 273-283, 2015.

GALVIN-KING, P.; HAUGHEY, S. A.; ELLIOTT, C. T. Herb and spice fraud; the drivers, challenges and detection. **Food Control**, v. 88, p. 85-97, 2018.

GARBOWSKA, M.; BERTHOLD-PLUTA, A.; STASIAK-ROSANSKA, L. Microbiological quality of selected spices and herbs including the presence of *Cronobacter* spp. **Food Microbiology**, v. 49, p. 1-5, 2015.

GIRARDELLO, R.; GALES, A. C. Resistência às polimixinas: velhos antibióticos, últimas opções terapêuticas. **Revista de Epidemiologia e Controle da Infecção**, v. 2, n. 2, p. 66-69, 2012.

GHISALBERTI, E. L. Propolis: A Review. **Bee World**, v. 60, n. 2, p. 59-84, 1979.

GHODKI, B. M.; GOSWAMI, T. K. Effect of grinding temperatures on particle and physicochemical characteristics of black pepper powder. **Powder Technology**, v. 299, p. 168-177, 2016.

GHOSH, C.; SARKAR, P.; ISSA, R.; HALDAR, J. Alternatives to conventional antibiotics in the era of antimicrobial resistance. **Trends in Microbiology**, v. 27, n. 4, p. 323-338, 2019.

GOLDEN, C. E.; BERRANG, M. E.; KERR, W. L.; HARRISON, M. A. Slow-release chlorine dioxide gas treatment as a means to reduce *Salmonella* contamination on spices. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 52, p. 256-261, 2019.

GOLIN, A.; CODEN, M. A. S.; ROLIM, R. I.; BERTAGNOLLI, S. M. M.; MARGUTTI, K. M. M.; BASSO, C. Hygienic-sanitary quality and the marketers and users profile of santa maria's street markets. **Disciplinarum Scientia**, v. 17, n. 3, p. 423-434, 2016.

GOMES, S.; MACEDO, M. R. P.; PESENTI, T.; PEREIRA, D. B.; CIRNE, M. P.; MÜLLER, G. Isolamento de *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* em *Calidris fuscicollis* (Aves: Scolopacidade) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Ornithologia**, v. 8, n. 1, p. 43-45, 2015.

GOMES, T. A.; ELIAS, W. P.; SCALETSKY, I. C. A.; GUTH, B. C.; RODRIGUES, J. F.; PIAZZA, R. M. F.; FERREIRA, L. C. S.; MARTINEZ, M. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 3-30, 2016.

GÓMEZ-ALDAPA, C. A.; SEGOVIA-CRUZ, J. A.; CERNA-CORTES, J. F.; RANGEL-VARGAS, E.; SALAS-RANGEL, L. P.; GUTIERREZ-ALCANTARA, E. J.;

CASTRO-ROSA, J. Prevalence and behavior of multidrug-resistant Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, enteropathogenic *E. coli* and enterotoxigenic *E. coli* on coriander. **Food Microbiology**, v. 59, p. 97-103, 2016.

GUIMARÃES, O. D.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antimicrobianos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Revista Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

GULDIKEN, B.; OZKAN, G.; CATALKAYA, G.; CEYLAN, F. D.; YALCINKAYA, I. E.; CAPANOGLU, E. Phytochemicals of herbs and spices: Health versus toxicological effects. **Food and Chemical Toxicology**, v. 119, p. 37-49, 2018.

GYAWALI, R.; IBRAHIM, S. A. Natural products as antimicrobial agents. **Food Control**, v. 46, p. 412-429, 2014.

HARA-KUDO, Y.; OHTSUKA, L. K.; ONOUE, Y.; OTOMO, Y.; FURUKAWA, I.; YAMAJI, A.; SEGAWA, Y.; TAKATORI, K. *Salmonella* prevalence and total microbial and spore populations in spices imported to Japan. **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 10, p. 2519-2523, 2006.

HARIRAM, U.; LABBÉ, R. Spore Prevalence and Toxigenicity of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Isolates from U.S. Retail Spices. **Journal of Food Protection**, v. 78, n. 3, p. 590-596, 2015.

HASSANIN, S. I. A.; EL-DALY, E. S. A. Effect of propolis and garlic on Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* fillets during frozen storage. **Journal of the arabian aquaculture society**, v. 8, n. 1, p. 237-248, 2013.

HASSAN, B.; CHATHA, S. A. S.; HUSSAIN, A. I.; ZIA, K. M. N. Recent advances on polysaccharides, lipids and protein based edible films and coatings: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 109, p. 1095-1107, 2018.

HEINI, N.; STEPHAN, R.; EHLING-SCHULZ, M.; JOHLER, S. Characterization of *Bacillus cereus* group isolates from powdered food products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 283, p. 59-64, 2018.

HERRERA-LÓPEZ, M. G.; RUBIO-HERNÁNDEZ, E. I.; LEYTE-LUGO, M. A.; SCHINKOVITZ, A.; RICHOMME, P.; CALVO-IRABIÉN, L. M.; PEÑA-RODRÍGUEZ, L. M. Botanical origin of triterpenoids from Yucatecan propolis. **Phytochemistry Letters**, v. 29, p. 25-29, 2019.

HOLSCHBACH, C. L.; PEEK, S. F. *Salmonella* in Dairy Cattle. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 34, n. 1, p.133-154, 2018.

HORTIFRUTI BRASIL. Ervas e Especiarias: o complemento que faz toda a diferença. **CEPEA-ESALQ/USP**, v. 14, n. 147, 2015.

ICMSF. INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microorganisms in foods: 2. Sampling for**

microbiological analysis: principles and specific application. Toronto: University of Toronto Press, p. 213, 1974.

KADARIYA, J.; SMITH, T.; THAPALIYA, D. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 9, 2014.

KHAN, M.; KHAN, S. T.; KHAN, N. A.; MAHMOOD, A.; AL-KEDHAIRY, A. A.; ALKHATHLAN, H. Z. The composition of the essential oil and aqueous distillate of *Origanum vulgare* L. growing in Saudi Arabia and evaluation of their antibacterial activity. **Arabian Journal Of Chemistry**, v. 11, n. 8, p. 1189-1200, 2018.

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

KAWATRA, P.; RAJAGOPALAN, R. Cinnamon: mystic powers of a minute ingredient. **Pharmacognosy Research**, v. 7, n. 5, p. 1-6, 2015.

KAYE, K. S.; POGUE, J. M.; TRAN, T. B.; NATION, R. L.; LI, J. Agents of Last Resort: Polymyxin Resistance. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 2, p. 391-414, 2016.

KIM, Y. S.; LEE, S.H.; KIM, S. H.; JOO, Y.; BAHK, G. J. Investigation of the experience of foodborne illness and estimation of the incidence of foodborne disease in South Korea. **Food Control**, v. 47, p. 226-230, 2015.

KNEIFEL, W; BERGER, E. Microbiological criteria for random samples of spices and herbs marketed on the Austrian market. **Journal of Food Protection**, v. 57, p. 893-901, 1994.

KOHL, T.; PONTAROLO, G. H.; PEDRASSANI, D. Resistência antimicrobiana de bactérias isoladas de amostras de animais atendidos em hospital veterinário. **Saúde e meio ambiente: revista interdisciplinar**, v. 5, n. 2, p. 115-127, 2016.

KUBILIENE, L.; LAUGALIENE, V.; PAVILONIS, A.; MARUSKA, A.; MAJIENE, D.; BARCAUSKAITE, K. KUBILIUS, R.; KASPARAVICIENE, G.; SAVICKAS, A. Alternative preparation of propolis extracts: comparison of their composition and biological activities. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, p. 156-162, 2015.

KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, Y.; BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOVA, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, n. 3, p. 235-240, 1999.

LENTZ, M. A. S.; RIVAS, P. M.; CARDOSO, M. R. I.; MORALES, D. L.; CENTENARO, F. C.; MARTINS, A. F. *Bacillus cereus* as the main casual agent of

foodborne outbreaks in Southern Brazil : data from 11 years. **Caderno de Saúde Pública**, v. 34, n. 4, p.1-9, 2018.

LINS, P. Antimicrobial activities of spices and herbs against *Salmonella Oranienburg*. **Food Control**, v. 83, p. 123-130, 2018.

LI, Q.; LI, Y.; TANG, Y.; MENG, C.; INGMER, H.; JIAO, X. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus argenteus* in chicken from retail markets in China. **Food Control**, v. 96, p.158-164, 2019.

LOYOLA, A. B. A.; SIQUEIRA, F. C.; PAIVA, L. F.; SCHREIBER, A. Z. Análise Microbiológica de especiarias comercializadas em Pouso Alegre, Minas Gerais. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 5, n. 1, p. 515-529, 2014.

MARCUCCI, M. C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v. 26, n. 2, p. 83-99, 1995.

MARTÍNEZ-GRACIÁ, C.; GONZALEZ-BERMUDEZ, C. A.; CABELLERO-VALCARCEL, A. M.; SANTAELLA-PASCUALAND, M.; FRONTELA-SASETA, C. Use of herbs and spices for food preservation: advantages and limitations. **Current Opinion in Food Science**, v. 6, p. 38-43, 2015.

MARTINS, A. G.; FERREIRA, C. S. Caracterização das condições higiênico-sanitária das feiras livres da cidade de Macapá e Santana-AP. **Revista Arquivo Científicos**, v. 1, n.1, p. 28-35, 2018.

MATOS, D. A. Mapas cotidianos da feira livre de Cachoeira – BA : cultura, hegemonia e estrutura de sentimento. **E-compós**, 2018.

MOLNÁR, H.; VIDÁCS, I.; BAKA, E.; CSERHALMI, Z.; FERENCZI, S.; FARKAS, R. T.; ADÁNYI, N.; SZÉKÁCS, A. The effect of different decontamination methods on the microbial load, bioactive components, aroma and colour of spice paprika. **Food Control**, v. 83, p.131-140, 2018.

MOREIRA, P. L.; P. L.; LOURENÇÃO, T. B.; PINTO, P. A. N.; RALL, V. L. M. Microbiological Quality of spices marketed in the city of Botucatu, São Paulo, Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 72, p. 421-424, 2009.

MORSHEDLOO, M. R.; SALAMI, S. A.; NAZERI, V.; MAGGI, F.; CRAKER, L. Essential oil profile of oregano (*Origanum vulgare* L.) populations grown under similar soil and climate conditions. **Industrial Crops and Products**, v. 119, p. 183-190, 2018.

NAIR, M. S.; SAXENA, A.; KAUR, C. Effect of chitosan and alginate based coatings enriched with pomegranate peel extract to extend the postharvest quality of guava (*Psidium guajava* L.). **Food Chemistry**, v. 240, p. 245-252, 2018.

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

NEI, D.; ENOMOTO, K.; NAKAMURA, N. A gaseous acetic acid treatment to disinfect fenugreek seeds and *black pepper* inoculated with pathogenic and spoilage bacteria. **Food Microbiology**, v. 49, p. 226-230, 2015.

NEITZKE, D. C.; ROZA, C. R.; FERNANDA, H. W. Food safety: *Salmonella* sp. contamination in swine slaughter. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 20, n. 2, 2017.

NETO, C.; SILVA, F. V.; MACHADO, A. P. Incidência de espécies fúngicas potencialmente toxigênicas em especiarias. **Ensaio e Ciência: C. Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 17, n. 1, p. 9-18, 2013.

NGUYEN, A. T.; TALLENT, S. M. Screening food for *Bacillus cereus* toxins using whole genome sequencing. **Food Microbiology**, v. 78, p. 164-170, 2019.

NGUYEN, L.; DUONG, L. T.; MENTREDDY, R. S. The U.S. import demand for spices and herbs by differentiated sources. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 12, p. 13-20, 2019.

NIKAIDO, H.; PAGÈS, J. M. Broad-specificity efflux pumps and their role in multidrug resistance of Gram-negative bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 2, p. 340-63, 2012.

NOGUEIRA, H. S.; XAVIER, A. R. E. O.; XAVIER, M. A. S.; CARVALHO, A. A.; MONÇÃO, G. A.; BARRETO, N. A. P. Antibacterianos: principais classes, mecanismos de ação e resistência. **UNIMONTES CIENTÍFICA**, v. 18, n. 2, 2016.

NORHANA, M. N. W.; POOLE, S. E.; DEETH, H. C.; GARY, A. D. Prevalence, persistence and control of *Salmonella* and *Listeria* in shrimp and shrimp products: a review. **Food Control**, v. 21, p. 343-361, 2010.

OLIVEIRA, R. A.; OLIVEIRA, F. F.; SACRAMENTO, C. K. Óleos essenciais: perspectivas para o agronegócio de especiarias na Bahia. **Bahia Agrícola**, v. 8, n. 1, 2007.

OMS-OLIU, G.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTÍN-BELLOSO, O. Using polysaccharide-based edible coatings to enhance quality and antioxidant properties of fresh-cut melon. **Lwt-Food Science and Technology**, v. 41, n. 10, p. 1862-1870, 2008.

OSIMANI, A.; AQUILANTI, L.; CLEMENTI, F. *Bacillus cereus* foodborne outbreaks in mass catering. **International Journal of Hospitality Management**, v. 72, p. 145-153, 2018.

PASSOS, F. R.; MENDES, F. B.; CUNHA, M. C.; PIGOZZI, M. T.; CARVALHO, A. M. X. Propolis extract in postharvest conservation banana prata. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 38, n. 2, p. 1-2, 2016.

PASTOR, C.; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L.; MARCILLA, A.; CHIRALT, A.; CHÁFER, M.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C. Quality and safety of table grapes coated with

hydroxypropylmethylcellulose edible coatings containing propolis extract. **Postharvest Biology and Technology**, v. 60, n. 1, p. 64-70, 2011.

PENDER, D. N.; CRAWFORD, P. F.; CLARK, J. M.; CRAWFORD, A. J.; PRATS, A. A.; SHAH, A. Effect of water-soluble cinnamon extract on electrocardiographic parameters: an analysis of the Cinnamon. **Complementary Therapies in Medicine**, v. 41, p. 302-305, 2018.

PISOSCHI, A. M.; POP, A.; GEORGESCU, C.; TURCUS, V.; OLAH, N. K.; MATHE, E. An overview of natural antimicrobials role in food. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 143, p. 922-935, 2018.

POBIEGA, K.; KRAŚNIEWSKA, K.; GNIEWOSZ, M. Application of propolis in antimicrobial and antioxidative protection of food quality – A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 83, p. 53-62, 2019.

RIBEIRO-SANTOS, R.; ANDRADE, M. MADELLA, D.; MARTINAZZO, A. P.; MOURA, L. A. G.; MELO, N. R.; SILVA, A. S. Revisiting an ancient spice with medicinal purposes: Cinnamon. **Trends in Food Science & Technology**, v. 62, p.154-169, 2017.

RUBAB, M.; SHAHBAZ, H. M.; OLAIMAT, A. N.; OH, D. Biosensors for rapid and sensitive detection of *Staphylococcus aureus* in food. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 105, p. 49-57, 2018.

SAGDIC, O; SILICI, S.; YETIM, H. Fate of *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7 in apple juice treated with propolis extract. **Annals of Microbiology**, v. 57, n. 3, p. 345-348, 2007.

SALES, W. B.; TUNALA, J. F.; VASCO, J. F. M.; RAVAZZANI, E. D. A.; CAVEIÃO, C. Ocorrência de coliformes totais e termotolerantes em pastéis fritos vendidos em bares no centro de Curitiba-PR. **Demetra**, v. 10, n. 1, p. 77-85, 2015.

SANTANA, E. H. W.; BELOTI, V.; ARAGON-ALEGRO, L. C.; MENDONÇA, M. B. O. C. Estafilococos em alimentos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 3, p. 545-554, 2010.

SANTOS, L. L. M. P.; MENDES, M. A.; CALAFANGE, R. M.; LIMA, S. M. S. Condições higiênico-sanitárias das carnes aves e pescados comercializados na feira central de Campina Grande – PB: percepções dos comerciantes x realidade. **SCIRE - Revista Acadêmico-Científica**, v. 6, n. 2, p. 1-9, 2014.

SANTOS, D. V. A.; OLIVEIRA, G. A.; PACHECO, L. G.; FARIA, L. M. O.; CUNHA, J. C.; MELLO, T. M. Antibióticos através da abordagem do mecanismo de resistência bacteriana. **Ciência Atual**, v. 12, n. 2, 2018.

SCHAARSCHMIDT, S.; SPRADAU, F.; MANK, H.; BANACH, J. L.; H. J.; FELS-KLERX, V.; HILLER, P.; APPEL, B.; BRAUNIG, J.; WICHMANN-SCHAUER, H.; MADE, A. Public and private standards for dried culinary herbs and spices-Part II:

Production and product standards for ensuring microbiological safety. **Food Control**, v. 70, p. 360-370, 2016.

SCHWEIGGERT, U.; CARLE, R.; SCHIEBER, A. Conventional and alternative processes for spice production—a review. **Trends In Food Science & Technology**, v. 18, n. 5, p. 260-268, 2007.

SEMRET, M.; HARAOU, L. Antimicrobial Resistance in the Tropics. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 33, n. 1, p. 231-245, 2019.

SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 253-260, 2011.

SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V.; KUROPATNICKI, A. K. Medical benefits of honeybee products. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 20, n. 17, 2017.

SILICI, S.; KARAMAN, K. Inhibitory effect of propolis on patulin production of *Penicillium expansum* in apple juice. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 38, p. 1129-134, 2014.

SILVA, L. P.; ALVES, A. R.; BORBA, C. M.; MORBIN, M. Contaminação fúngica em condimentos de feiras livres e supermercados. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 1, p. 202-206, 2012.

SILVA, J. F.; MELO, B. A.; LEITE, D. T.; CORDEIRO, M. F. R.; PESSOA, E. B.; BARRETO, C. F.; FERREIRA, T. C. Análise microbiológica de condimentos comercializados na feira central de Campina Grande – PB. **Agropecuária científica no seminário**, v. 9, n. 2, p. 83-87, 2013.

SILVA, J. R.; VARGEM, D. S.; SANTOS, W.; FRUTUOSO, G. F.; VIEIRA, E. F.; MENEZES, E. D. Inativação por hidrólise alcalina de antibiótico β -lactâmicos, cefalosporínicos e penicilâmicos. **Ensaio e Ciências Biológicas, Agrárias e da saúde**, v. 17, n. 1, p. 19-31, 2013.

SOUZA, T. M.; ATAYDE, H. M. Educação higiênico-sanitária dos feirantes do Mercado 2000 e Feira do Pescado em Santarém-PA. **Revista Brasileira de Extensão universitária**, v. 8, n. 3, p. 127-134, 2017.

SRINIVASAN, K. Black Pepper and its pungent principle-piperine: a review of diverse physiological effects. **Journal Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 47, n. 8, p. 735-748, 2007.

SZÉKÁCS, A.; WILKINSON, M. G.; MADER, A.; APPEL, B. Environmental and food safety of spices and herbs along global food chains. **Food Control**, v. 83, p.1-6, 2018.

TENOVER, F. C. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. **The American Journal of Medicine**, v. 119, n. 6, p. 3-10, 2006.

TORLAK, E.; SERT, D. Antibacterial effectiveness of chitosan–propolis coated polypropylene films against foodborne pathogens. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 60, p. 52-55, 2013.

TRINETTA, V. Edible Packaging. **Reference Module in Food Science**, p. 1-2, 2016.

VAN DOREN, J. M.; NEIL, K. P.; PARISH, M.; GIERALTOWSKI, L.; GOULD, L.H; GOMBAS, K. L. Foodborne illness outbreaks from microbial contaminants in spices, 1973-2010. **Food Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 456-464, 2013.

VÁSQUEZ-GARCÍA, A.; OLIVEIRA, A. P. S. C.; MEJIA-BALLESTEROS, J. E.; GODOY, S. H.; BARBIERI, E.; SOUSA, R. L. M.; FERNANDES, A. M. *Escherichia coli* detection and identification in shellfish from southeastern Brazil. **Aquaculture**, v. 504, p.158-163, 2019.

VELGE, P.; WIEDEMANN, A.; ROSSELIN, M.; ABED, N.; BOUMART, Z.; CHAUSSÉ, A. M.; GRÉPINET, O.; NAMDARI, F.; ROCHE, S. M.; ROSSIGNOL, A.; VIRLOGEUX-PAYANT, I. Multiplicity os *Salmonella* entry mechanisms, a new paradigm for *Salmonella* pathogenesis. **Microbiology Open**, v. 1, n. 3, p. 243-25, 2012.

VIERA, V. B.; PIOVESAN, N.; MORO, K. I. B.; RODRIGUES, A. S.; SCAPIN, G.; ROSA, C. S.; KUBOTA, E. H. Preparation and microbiological analysis of Tuscan sausage with added propolis extract. **Food Science and Technology**, v. 36, n. 1, p. 37-41, 2016.

WHO. World Health Organization. **Resistência antimicrobiana: Relatório global sobre vigilância**, 2014. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112642/9789241564748eng.pdf>. Acesso em: 18. fev. 2019.

WHO. World Health Organization. **Antimicrobial resistance, 2018**. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>. Acesso em: 18 de fev. 2019.

YOUSUF, B.; QADRI, O. S.; SRIVASTAVA, A. K. Recent developments in shelf-life extension of fresh-cut fruits and vegetables by application of different edible coatings: A review. **Lwt**, v. 89, p. 198-209, 2018.

WILSON, D. N. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 35-48, 2014.

YANG, W.; WU, Z.; HUANG, Z. Y.; MIAO, X. Preservation of orange juice using propolis. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 11, p. 3375-3383, 2017.

ZARE, R.; NADJARZADEH, A.; ZARSHENAS M. M, SHAMS M.; HEYDARI, M. Efficacy of cinnamon in patients with type II diabetes mellitus: A randomized controlled clinical trial. **Clinical Nutrition**, v. 38, n. 2, p. 549-556, 2019.

ZARAI, Z.; BOUJELBENE, E.; SALEM, N. B.; GARGOURI, Y.; SAYARI, A. Antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts, piperine and piperic acid from *Piper nigrum*. **Lwt-Food Science And Technology**, v. 50, n. 2, p. 634-641, 2013.

ZHANG, X.; GUO, Y.; WANG, C.; LI, G.; XU, J.; CHUNG, H. Y.; YE, W.; LI, Y.; WANG, G. Phenolic compounds from *Origanum vulgare* and their antioxidant and antiviral activities. **Food Chemistry**, v. 152, p. 300-306, 2014.

ZHU, F.; MOJEL, R.; LI, G. Structure of black pepper (*Piper nigrum*) starch. **Food Hydrocolloids**, v. 71, p.102-107, 2017.

ZWEIFEL, C.; STEPHAN, R. Spices and herbs as source of *Salmonella*-related foodborne diseases. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 765-769, 2012.

CAPÍTULO 2

Risco da veiculação de bactérias resistentes a antimicrobianos em especiarias comercializadas em feiras livres

Artigo a ser submetido à Revista Ciência Rural

Risco da veiculação de bactérias resistentes a antimicrobianos em especiarias comercializadas em feiras livres

Risk of antimicrobial resistant bacteria in spices marketed in fairs

Milena da Cruz Costa^I, Alessandra Iarlen Cabral Cruz^I, Aline Simões da Rocha Bispo^I,
João Albany Costa^{II}, Norma Suely Evangelista-Barreto^I

RESUMO - O objetivo do trabalho foi avaliar a qualidade microbiológica de especiarias comercializadas em feiras livres de municípios no Recôncavo Baiano e traçar o perfil de resistência das cepas frente a diferentes fármacos. Foi realizada a quantificação de coliformes a 45 °C, *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* spp. e *Bacillus cereus* e verificado a presença de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp., O crescimento microbiano foi significativamente maior nas amostras de pimenta-do-reino (4,66 log UFC g⁻¹), quando comparado com as amostras de canela (2,55 log UFC g⁻¹) e orégano (2,49 log UFC g⁻¹). Em todas as especiarias a maior contagem foi para *B. cereus* (4,52 log UFC g⁻¹) e a menor para o grupo coliforme (1,64 log NMP g⁻¹). *E. coli* e *Salmonella* spp. foram isoladas na pimenta-do-reino em 89% e 67% das amostras, respectivamente. *B. cereus* e *S. aureus* apresentaram maior resistência aos antimicrobianos da classe dos β-lactâmicos (penicilina, oxacilina e cefepime). *E. coli* foi mais resistente a ampicilina e *Salmonella* spp. apresentou elevada resistência (100%) ao ácido nalidíxico, ampicilina e ceftriaxona. A maioria das cepas dos Gram-positivos com multirresistência (cerca de 40%) apresentaram índice MAR de 0,33 (resistência a 3 antimicrobianos). O perfil de multirresistência em *Salmonella* spp. variou de 0,16 a 0,91, ou seja, resistência até 11 antimicrobianos, e para *E. coli* até 7 antimicrobianos (0,58). As especiarias comercializadas nas feiras livres do Recôncavo da Bahia apresentam baixa qualidade microbiológica, com a presença de patógenos com elevada resistência a antimicrobianos comumente prescritos pela comunidade médica.

Palavras-chave: Qualidade microbiológica. Segurança alimentar. Multirresistência.

^ICentro de Ciências Agrárias, Biológicas e Ambiental, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB, Cruz das Almas, Bahia, Brasil.

^{II} Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB, Cruz das Almas, Bahia, Brasil.

ABSTRACT - The aim of this study was to evaluate the microbiological quality of spices marketed at municipal street markets in the Recôncavo Baiano and to establish a profile of the resistance of the strains to different drugs. It was verified the presence of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp., The quantification of coliforms at 45 °C, *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Bacillus* spp. and *Bacillus cereus*. The microbial growth was significantly higher in the black pepper samples (4.66 log CFU g⁻¹) than in the samples of cinnamon (2.55 log CFU g⁻¹) and oregano (2.49 log CFU g⁻¹). In all spices the highest counts were for *B. cereus* (4.52 log CFU g⁻¹) and the lowest for the coliform group (1.64 log NMP g⁻¹). *E. coli* and *Salmonella* spp. were isolated in the pepper in 89% and 67% of the samples, respectively. *B. cereus* and *S. aureus* presented higher resistance to β -lactam antibiotics (penicillin, oxacillin and cefepime). *E. coli* was more resistant to ampicillin and *Salmonella* spp. presented high resistance (100%) to nalidixic acid, ampicillin and ceftriaxone. Most gram-positive strains with multidrug resistance (around 40%) had MAR index of 0.33 (resistance to 3 antimicrobials). The multiresistance profile in *Salmonella* spp. ranged from 0.16 to 0.91, resistance up to 11 antimicrobials, and for *E. coli* up to 7 antimicrobials (0.58). Spices marketed in the street markets of Recôncavo da Bahia have low microbiological quality, with the presence of pathogens with high resistance to antimicrobials commonly prescribed by the medical community.

Key words: Microbiological quality. Food safety. Multiresistance.

INTRODUÇÃO

Mundialmente, as especiarias são utilizadas no preparo de alimentos, principalmente devido suas propriedades aromatizantes (FOGELE et al., 2018). Dentre as formas de comercialização, se destacam as feiras livres, que é um tipo de comércio varejista ao ar livre. No Brasil, um dos grandes problemas associado a esse tipo de comercialização de alimentos é a infraestrutura inadequada e condições higiênicosanitárias precárias (MARTINS & FERREIRA, 2018). Outro fator que pode contribuir para a contaminação das especiarias é a ausência de boas práticas de fabricação durante a cadeia produtiva, principalmente devido às condições de

processamento durante a exposição à secagem ao sol em campos abertos e durante o armazenamento (FOGELE, et al. 2018).

Apesar da existência de várias normativas de orientação se encontrarem disponíveis para atender aos padrões exigidos com relação à produção, processamento e uso das especiarias, (ESA, 2015; ASTA, 2017) estes produtos registram o maior número de notificações de surtos de doenças veiculados por alimentos (DVA) de acordo com o sistema europeu de alerta rápido para alimentos e rações (RASFF, 2019). No Brasil, as especiarias se encontram entre os 16 alimentos mais envolvidos em surtos de DVA, com um percentual de ocorrência de 0,9%. Apesar da baixa notificação, não deixa de ser significativo visto que cerca de 48% dos alimentos envolvidos nos surtos não são identificados. Entre os microrganismos mais envolvidos em surtos de DVA se destacam *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e coliformes (BRASIL, 2019).

Nos últimos anos, o aumento da resistência microbiana tem ocasionado consequências graves à saúde pública restringindo as opções terapêuticas de combate ao desenvolvimento de bactérias patogênicas (SEMRET; HARAQUI, 2019), incluindo as que se disseminam através da cadeia alimentar. Em vegetais, a presença de bactérias resistentes aos agentes antimicrobianos pode estar associada à utilização de esterco animal na adubação do solo, que ao ser absorvidos se acumulam nos tecidos vegetais, resultando em risco para os consumidores desses alimentos (REGINATO & LEAL, 2004).

Normalmente, as especiarias são mantidas à temperatura ambiente durante o armazenamento e comercialização nas feiras livres por tempo suficiente para favorecer a multiplicação microbiana. Como são adicionadas aos alimentos crus, como saladas cruas, ou alimentos prontos, sua adição representa um risco para a saúde dos consumidores. Ao mesmo tempo, o consumo de especiarias cruas pode contribuir com a disseminação de cepas resistentes, visto que no trato gastrointestinal do homem, genes de resistência podem ser transferidos para os microrganismos comensais da microbiota do hospedeiro. Dessa forma, este estudo teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica das especiarias comercializadas em feiras livres dos municípios do Recôncavo Baiano e verificar o perfil de resistência microbiana a fármacos comerciais.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das amostras

As amostras foram coletadas no período de fevereiro a junho de 2018, em feiras livres nos municípios de Cruz das Almas, Santo Antônio de Jesus e Cachoeira, no Recôncavo da Bahia. Foram coletadas nove amostras de cada especiaria: pimenta-do-reino (*Piper Nigrum* L.), canela (*Cinnamomum* sp.) e orégano (*Origanum vulgare* L.), comercializadas a granel. Em cada feira foram obtidos 100 g de cada especiaria, de cinco barracas de feirantes e obtido uma amostra composta (500 g para cada especiaria). As amostras foram obtidas em sacos transparentes de polietileno, da mesma forma como são disponibilizadas aos clientes.

Análises microbiológicas

Foram determinados os números de *Staphylococcus* spp., *Bacillus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, coliformes a 45 °C e presença de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. As análises foram realizadas por meio das técnicas preconizadas no Bacteriological Analytical Manual (BAM) descritas por (SILVA et al., 2010).

Cada amostra foi pesada (25 g) e homogeneizada (225 mL) em solução salina a 0,85% até diluição 10^{-5} . A contagem de *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus aureus* foi realizada por meio da técnica de semeadura em superfície em ágar Baird-Parker com incubação a 35 °C/48 h. As colônias típicas (pretas, circulares, pequenas, rodeadas por uma zona opaca e/ou um halo transparente) foram submetidas aos testes de confirmação bioquímica de catalase, termonuclease e coagulase.

A estimativa do número mais provável (NMP) de coliformes a 45 °C foi realizada pela técnica de fermentação em tubos múltiplos e os resultados expressos em NMP g⁻¹. A presença de *E. coli* foi verificada pelo plaqueamento em meio ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) e os testes bioquímicos do IMVIC (Indol, Vermelho de Metila, Voges-Proskauer e Citrato).

Para a pesquisa de *Salmonella* spp. foram realizados pré-enriquecimento em caldo Triptona de Soja (TSB), seguido de enriquecimento seletivo (caldos Tetrionato e Rappaport), inoculação em meios seletivos (ágar Hektoen e ágar Verde Brillhante), isolamento das cepas, provas bioquímicas (TSI, LIA, urease, indol, citrato, lisina e

malonato) e teste sorológico usando soro polivalente somático (antígenos O e Vi) da Probac®.

A contagem de *Bacillus* spp. e *B. cereus* foi realizada por meio da semeadura em superfície em ágar Manitol Gema de Ovo Polimixina (MYP). As colônias típicas (colônias com grande halo de precipitação com coloração rósea leitosa) foram confirmadas nos testes bioquímicos de nitrato, motilidade, glicose, VP e tirosina.

Teste de suscetibilidade antimicrobiana

A suscetibilidade antimicrobiana foi avaliada pelo método de difusão em disco seguindo a metodologia proposta pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2014). Para o teste foram utilizadas 32 cepas de *E. coli*, 20 de *Salmonella* spp., 72 de *Bacillus cereus* e 34 de *Staphylococcus aureus*. Os inóculos foram padronizados em espectrofotômetro a 625 nm, usando 0,5 da escala McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹) e inoculados em placas contendo ágar Muller-Hinton com incubação a 37 °C/24 h. Os halos de inibição foram medidos em milímetros com o uso de paquímetro digital.

Para os testes de sensibilidade foram selecionados nove antimicrobianos comerciais para as bactérias Gram-positivas: penicilina (10 µg), tetraciclina (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), sulfazotrim (25 µg), cefepime (30 µg), eritromicina (15 µg), clindamicina (2 µg), oxacilina (1 µg) e cloranfenicol (30 µg) e 12 antimicrobianos para as Gram-negativas: ácido nalidíxico (30 µg), ceftriaxona (30 µg), imipenem (10 µg), sulfazotrim (25 µg), tetraciclina (30 µg), ampicilina (10 µg), ceftazidima (30 µg), amicacina (30 µg), aztreonam (30 µg), cloranfenicol (30 µg), gentamicina (10 µg) e nitrofurantoína (300 µg). Os perfis de resistência e sensibilidade foram estabelecidos de acordo com o Manual do fabricante dos discos de antimicrobianos (LABORCLIN, 2011).

Índice de múltipla resistência antimicrobiana (MAR)

O índice de Múltipla Resistência Antimicrobiana (MAR) foi calculado usando a fórmula: Índice MAR = a/b, onde: (a) o número de antimicrobianos, ao qual o isolado foi resistente e (b) número de antimicrobianos, ao qual o isolado foi exposto (KRUMPERMAN, 1983).

Análise estatística

Os valores das variáveis NMP g^{-1} e UFC g^{-1} resultantes das análises microbiológicas foram transformados em Log (x+10) e os dados foram submetidos à análise de variância no delineamento inteiramente casualizado (DIC). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). As análises univariadas foram realizadas com o programa Sisvar Software, versão 5.6. Também foi realizada análise de componentes principais (ACP), utilizando análise de agrupamento segundo algoritmo aglomerativo do método de Ward combinado à medida de distância euclidiana. Em seguida foi realizada a classificação hierárquica em diagramas de ordenação quanto ao percentual do perfil de resistência microbiana nas especiarias. Para execução dessas análises foi utilizado o software SPSS Statistics for Windows, versão 25.0 (IBM CORP, 2017).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve diferença estatística na contagem microbiana das especiarias entre os municípios. O que pode estar associado a fatores ambientais como temperatura em torno de 23 °C a 24 °C e umidade variando de 60% a 90%, uma vez que segundo a Superintendência de Estudos Econômicos e Sociais da Bahia os três municípios estão localizados geograficamente na mesma região e apresentam fatores climáticos semelhantes (SEI, 2012). Outros fatores que corroboram para a alta carga microbiana podem ser falhas higiênicas sanitárias durante a obtenção das especiarias que em sua maioria provêm do mesmo fornecedor. O excesso de manipulação durante a comercialização com exposição à poeira e insetos, prática observada nas feiras, também contribui para o aumento da contagem microbiana desses alimentos.

Na Tabela 1, a carga microbiana da pimenta-do-reino foi significativamente maior ($p > 0,05$), enquanto entre a canela e o orégano não houve diferença significativa entre si, considerando cada um dos microrganismos testados. A contagem de *B. cereus* foi mais elevada quando comparada aos demais bioindicadores em todas as especiarias, principalmente para a pimenta, embora sem diferença estatística para *Bacillus* spp. O grupo coliforme a 45 °C apresentou a menor contagem média.

Como a legislação brasileira de alimentos não estabelece limites para *B. cereus* em especiarias foi usado os limites estabelecidos pela European Commission (EC, 2004) que preconiza valores de 10^4 ou 4 log UFC g^{-1} . A pimenta-do-reino apresentou

contagens acima desse limite. Apesar de *B. cereus* ser a população bacteriana predominante em ervas e especiarias (BANERJEE & SARKAR, 2004), sua presença em grandes quantidades ($>10^5$ UFC g^{-1} ou $5 \log$ UFC g^{-1}) é preocupante, pois pode acarretar síndromes provenientes da toxina diarreica e emética (FRENTZEL et al., 2018). Resultados semelhantes foram verificados por FOGLE et al. (2018) ao relatarem maior contaminação por *B. cereus* na pimenta-preta moída, embora com valor médio ($2,49 \log$ UFC g^{-1}) inferior ao da presente pesquisa.

Tabela 1. Média microbiana ($\log x+1$) UFC g^{-1} e NMP g^{-1} dos bioindicadores em três especiarias comercializadas em feiras livres do Recôncavo Baiano.

Microrganismos	Especiarias			Média geral
	Pimenta-do-reino	Canela	Orégano	
<i>Bacillus</i> spp.	5,88±0,37 Aa	3,02±0,26 Bab	2,96±0,24 Ba	3,95 ab
<i>Bacillus cereus</i>	6,61±0,16 Aa	3,53±0,24 Ba	3,41±0,19 Ba	4,52 a
<i>Staphylococcus</i> spp.	3,64±0,56 Abc	2,37±0,31 Bb	2,30±0,22 Ba	2,77 c
<i>S. aureus</i>	4,45±0,29 Ab	2,66±0,17 Bab	2,80±0,34 Ba	3,30 bc
Coliformes 45 °C	2,73±0,38 Ac	1,19±0,12 Bc	1,00±0,00 Bb	1,64 d
Média geral	4,66 A	2,55 B	2,49 B	

*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula nas linhas e minúscula nas colunas não apresentam diferença significativa segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Staphylococcus spp. e *S. aureus* apresentaram maior contagem na pimenta-do-reino e diferiram estatisticamente da canela e orégano (Tabela 1). O risco da presença desse gênero é a produção de toxinas termoestáveis causando intoxicação alimentar, principalmente por *S. aureus* está associado à manipulação (SILVA; FEITOSA; RODRIGUES, 2017). Dentre os fatores que contribuem para o crescimento de *S. aureus* em especiarias se destaca a exposição dos produtos durante a comercialização a granel nas feiras livres associado ao hábito dos consumidores em tocar e sentir o cheiro dos produtos para perceberem as suas características (MARTINS & FERREIRA, 2018), como por exemplo, se estão secos ou apresentam cheiro forte. Outro fato que pode contribuir para a presença de *S. aureus* está relacionado com a sua capacidade de se

desenvolver em alimentos com baixa atividade de água (0,83 a 0,86), necessitando de A_w de 0,86 para a produção de toxinas (THANH et al., 2018).

O limite para coliformes a 45 °C em especiarias é de 5×10^2 ou 2,69 log NMP g^{-1} (BRASIL, 2001) e mais uma vez apenas a pimenta-do-reino apresentou contagens acima do limite estabelecido (Tabela 1). A presença de coliformes a 45 °C na pimenta-do-reino demonstra falhas nas boas práticas de processamento e armazenamento (MICHELIN et al., 2016), com contaminação de origem fecal devido a presença de *E. coli*.

E. coli e *Salmonella* spp. foram isoladas apenas na pimenta-do-reino (Figura 1A e 1B), o que pode ser atribuído à capacidade destes microrganismos se adaptarem às substâncias antimicrobianas presentes na pimenta como, por exemplo, o alcaloide piperina (ALDALY, 2010).

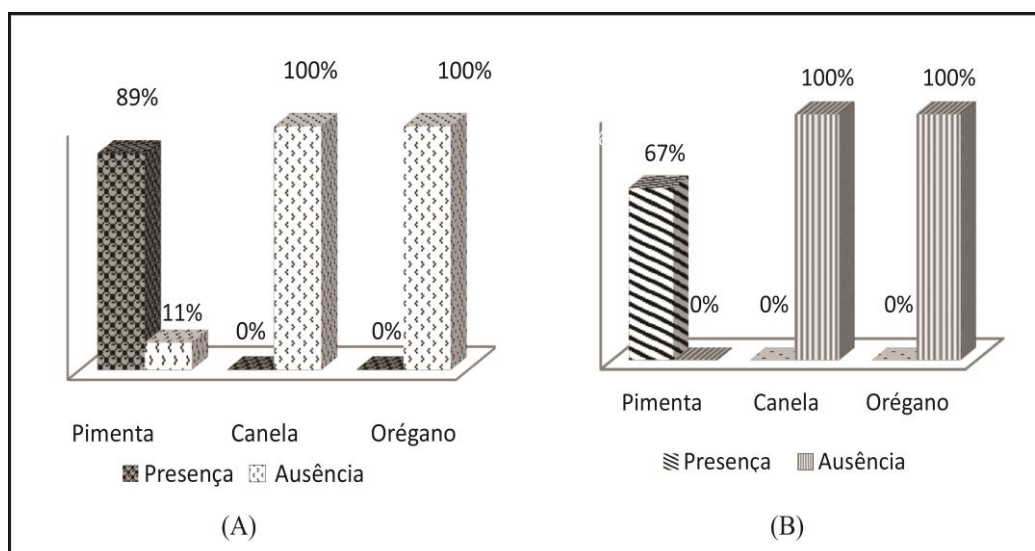


Figura 1. Presença de *Escherichia coli* (A) e *Salmonella* spp. (B) na pimenta-do-reino, canela e orégano comercializados em feiras livre de municípios do Recôncavo Baiano.

Acredita-se que a ausência de *E. coli* e *Salmonella* spp. na canela e orégano se deve a ação antimicrobiana reconhecida presente nelas. Como se sabe os principais compostos presentes na canela são o cinamaldeído e o eugenol que influenciam o transporte de íons e causam modificações na membrana bacteriana (BURT, 2004). Enquanto no orégano o timol e o carvacrol são responsáveis por causar modificações na membrana celular bacteriana, afetando sua permeabilidade e integridade (CEYLAN &

FUNG, 2004). Esses compostos têm apresentado bons resultados bactericidas e bacteriostáticos em bactérias Gram-negativas (LÓPEZ et al., 2005; ARAÚJO & LONGO, 2016).

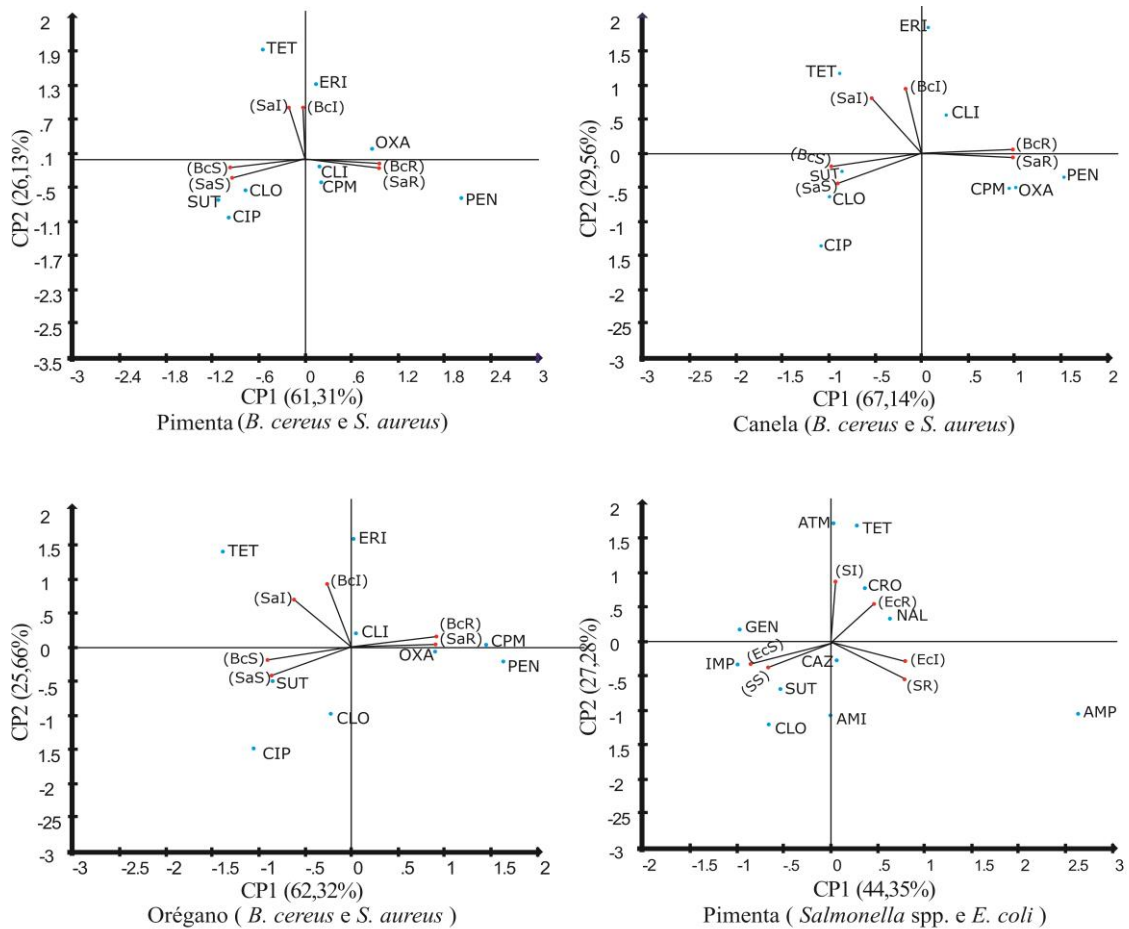
Embora as especiarias devam apresentar ausência de *Salmonella* spp. em 25 g da amostra (BRASIL, 2001), resultados semelhantes ao estudo também foram relatados por MICHELIN et al. (2016) ao encontrarem *Salmonella* spp. em pimenta-do-reino moída. Os autores destacaram a necessidade de conscientizar o produtor em relação às boas práticas de produção da pimenta, principalmente nas etapas pós-colheita, devido a maior vulnerabilidade às contaminações.

Com relação à resistência antimicrobiana das bactérias se verifica que todas as especiarias apresentaram cepas com elevado perfil de resistência. Das 158 cepas testadas, 67% apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano. A elevada prevalência de cepas resistentes aos antimicrobianos pode ser decorrente da carga residual de fármacos de uso humano e animal liberados no ambiente (REGITANO & LEAL, 2010).

Na Figura 2 estão representados os diagramas da dispersão, posicionamento dos escores e cargas fatoriais e da superposição dos pontos médios do perfil antimicrobiano de *B. cereus*, *S. aureus*, *Salmonella* spp. e *E. coli*. O comportamento de *B. cereus* e *S. aureus* foi semelhante em relação ao perfil de suscetibilidade antimicrobiana nas três especiarias, em que o primeiro componente (CP1) foi representado por meio do perfil de resistência e sensibilidade, enquanto o segundo componente (CP2) foi definido pelo perfil intermediário.

O perfil antimicrobiano de *B. cereus* e *S. aureus* mostra que os antimicrobianos menos eficientes foram penicilina (PEN) e oxacilina (OXA). Enquanto, os antimicrobianos com maior eficiência foram cloranfenicol (CLO), ciprofloxacina (CIP) e sulfazotrim (SUT), que constituíram quadrantes opostos formando a primeira componente principal, e apresentou uma variabilidade de 61,31%, 67,14% e 62,32% para os isolados da pimenta, canela e orégano, respectivamente. Com relação ao perfil intermediário, verificou-se um maior percentual para a tetraciclina e eritromicina, formando a segunda componente principal, quantificando para a variabilidade explicada para os isolados da pimenta (26,13%), canela (29,56%) e orégano (25,66%). Portanto, a soma das duas primeiras componentes determinaram 87,44% de variabilidade para os

isolados da pimenta-do-reino, 96,70%, da canela e 87,98% do orégano. Ainda que o perfil de resistência antimicrobiano das bactérias seja distinto, o comportamento dos microrganismos *B. cereus* e *S. aureus* foi semelhante entre as especiarias estudadas.



PEN - penicilina, CPM - cefepime, ERI - eritromicina, TET - tetraciclina, CLI - clindamicina, OXA - oxacilina, SUT - sulfazotrim, CLO - cloranfenicol, CIP - ciprofloxacina, BcR - *B. cereus* resistente, SaR - *S. aureus* resistente, BcI - *B. cereus* intermediário, SaI - *S. aureus* intermediário, BcS - *B. cereus* sensível, SaS - *S. aureus* sensível. AMP - ampicilina, CAZ - ceftazidima, ATM - aztreonam, NAL - ácido nalidixico, CRO - ceftriaxona, IMP - imipenem, NIT - nitrofurantoína, AMI - amicacina, GEN - gentamicina, EcR - *E. coli* resistente, SR - *Salmonella* resistente, EcI - *E. coli* intermediário, SI - *Salmonella* intermediário, EcS - *E. coli* sensível, SS - *Salmonella* sensível.

Figura 2. Dispersão, posicionamento dos escores e cargas fatoriais da superposição do perfil antimicrobiano de *Bacillus cereus*/*Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp./*Escherichia coli*.

A elevada resistência à penicilina tem se tornado cada vez mais frequente por se tratar de um dos antimicrobianos mais antigos utilizados no tratamento de infecções bacterianas respiratórias, como a pneumonia, e o uso contínuo deste fármaco na prática

clínica têm contribuído para o crescimento da resistência antimicrobiana (BELL, PEREIRA, PITA, 2015).

A explicação da variabilidade total registrada no percentual da atividade dos antimicrobianos sobre *Salmonella* spp. e *E. coli* na pimenta-do-reino somaram para os dois componentes principais (71,63%), menor do que o observado para *B. cereus* e *S. aureus*. *Salmonella* spp. foi resistente aos antimicrobianos AMP (ampicilina), CRO (ceftriaxona) e NAL (ácido nalidíxico), enquanto *E. coli* foi mais resistente a AMP (ampicilina), ATM (aztreonam) e TET (tetraciclina). O comportamento de *Salmonella* spp. e *E. coli* foi diferente quando comparado ao perfil dos antimicrobianos, uma vez que a primeira componente principal (44,35%) foi formada por EcI, EcS, SR e SS e a segunda componente principal (27,28%) foi formada por EcR e SI (Figura 2).

O aumento na resistência de *Salmonella* spp. a ceftriaxona é preocupante porque esse antimicrobiano tem sido importante no tratamento da salmonelose em crianças, visto que as cepas relatadas com resistência a esse fármaco tem sido associada aos genes β -lactamase AmpC (*bla*_{CMY-2} e *bla*_{TEM}) frequentemente transportados em integrons e plasmídeos ou mesmo transmitidos através de conjugação (CHEN et al., 2004). Já o ácido nalidíxico apesar de ser muito utilizado no tratamento de infecções do trato urinário em humanos e animais devido à sua efetividade contra a maioria das enterobactérias, nos últimos anos tem perdido a sua eficácia devido ao aumento da resistência microbiana (CAMPIONI; BERGAMINI; FALCÃO, 2012). Van Doren et al. (2013) também encontraram cepas de *Salmonella* spp. isoladas de especiarias, resistentes ao ácido nalidíxico e ampicilina.

Cepas de *E. coli* resistentes a ampicilina em alimentos tem sido um problema, uma vez que este fármaco pode ser uma alternativa no tratamento de infecções, principalmente urinário, onde *E. coli* é o agente causador mais implicado (EVANGELISTA-BARRETO et al., 2017). Outro fator preocupante se deve ao fato da maioria dos genes para a produção de enzimas β -lactamases residirem em regiões móveis do DNA bacteriano, tornando-os facilmente transferíveis para outras bactérias dentro do trato intestinal de animais de sangue quente (RASHEED et al., 2014).

B. cereus e *S. aureus* apresentaram índice de multirresistência (MAR), variando de 0,22 a 0,66, ou seja, resistência de dois a seis antimicrobianos. Em *E. coli* o índice MAR variou de 0,16 a 0,58 (resistência de dois a sete antimicrobianos), inferior

ao índice MAR de *Salmonella* que obteve valor máximo de 0,91, ou seja, resistência até 11 antimicrobianos (Tabela 2).

Tabela 2. Índice de múltipla resistência aos antimicrobianos (MAR) isoladas de especiarias.

Nº de cepas resistentes	Nº de antimicrobianos	Índice MAR	% de cepas com multirresistência
<i>Staphylococcus aureus</i>			
2	2	0,22	7
11	3	0,33	39
5	4	0,44	18
9	5	0,55	32
1	6	0,66	3
<i>Bacillus cereus</i>			
8	2	0,22	19
16	3	0,33	39
9	4	0,44	22
7	5	0,55	17
1	6	0,66	2
<i>Salmonella</i> spp.			
1	2	0,16	8
5	3	0,25	38
2	4	0,33	15
2	5	0,41	15
2	6	0,50	15
1	11	0,91	8
<i>Escherichia coli</i>			
1	2	0,16	14
1	3	0,25	14
2	4	0,33	28
2	5	0,41	28
1	7	0,58	14

Nº= número

Um dos fatores que pode ter contribuído para a alta resistência antimicrobiana (resistência até a 11 fármacos) é o fato dos microrganismos possuírem a capacidade de se adaptar a estrutura química de compostos fenólicos presentes nas especiarias, alguns desses compostos atuam na permeabilidade da parede celular de bactérias (COWAN, 1999). Quando os microrganismos são expostos aos antimicrobianos sintéticos que muitas vezes apresentam estrutura química semelhante aos compostos das especiarias eles expressam mecanismo de resistência semelhante.

Baseado nessa problemática verifica-se que as falhas existentes na cadeia produtiva das especiarias com a produção de produtos com elevada carga microbiana pode vir a potencializar a veiculação de bactérias resistentes. Este fato contribui para o consumo de especiarias com cepas multirresistentes a antimicrobianos comerciais que pode afetar o tratamento de doenças pois colaboram com o agravamento de quadros clínicos potencialmente curáveis.

CONCLUSÃO

As especiarias comercializadas nas três feiras livres do Recôncavo Baiano apresentam baixa qualidade microbiológica com a presença de patógenos como *Salmonella* spp. principalmente na pimenta-do-reino moída. Além disso, as especiarias contribuem com a disseminação de cepas de *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli* e *Salmonella* spp. com elevado índice de resistência a diversos antimicrobianos, principalmente a classe dos β -lactâmicos.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e da Fundação de Amparo à Pesquisa do estado da Bahia (FAPESB).

REFERÊNCIAS

ALDALY, Z.T.K. Antimicrobial Activity of Piperine purified from *Piper nigrum*. **Journal of Basrah Researches**, v.36, n.5, p.54-61, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5829/idosi.gjp.2013.7.1.1104>>. Acesso em: 1 maio. 2019. doi: 10.5829/idosi.gjp.2013.7.1.1104.

ARAUJO, M.M.; LONGO, P.L. In vitro antibacterial activity of *Origanum vulgare* (oregano) essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* strains. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.83, p.1-7, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/1808-1657000702014>>. Acesso em: 3 maio 2019. doi: 10.1590/1808-1657000702014.

ASTA - American Spice Trade Association. **Clean, safe spices: Guidance from the American spice trade association.** Washington, DC, 2017. Disponível em: <https://www.astaspice.org/food-safety/clean-safe-spices-guidance-document/>. Acesso em: 1 mar. 2019.

BANERJEE, M.; SARKAR, P.K. Growth and enterotoxin production by sporeforming bacterial pathogens from spices. **Food Control**, v.15, n.6, p.491-496, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2003.07.004>>. Acesso em: 6 jun. 2019. doi: 10.1016/j.foodcont.2003.07.004.

BELL, V.; PITA, J.R.; PEREIRA, A.L. A introdução da penicilina nos hospitais da universidade Coimbra, Portugal (1944-1946). **Asclepio. Revista de Historia de la Medicina y de la Ciencia**, v.68, n.1, p.137-153, 2016. Disponível em: <<http://asclepio.revistas.csic.es/index.php/asclepio/article/view/692/1006>>. Acesso em: 18 jun. 2019.

BRASIL. (2001). Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº. 12. **Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Poder executivo. Brasília, DF. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b>. Acesso em: 7 jun. 2019.

BRASIL. (2019). Ministério da Saúde. **Surtos de Doenças transmitidas por alimentos no Brasil–Fevereiro de 2019.** Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/fevereiro/15/Apresenta-o-Surtos-DTA-Fevereiro-2019.pdf>. Acesso em: 16 mar. 2019.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International journal of food microbiology**, v.94, n.3, p.223-253, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>>. Acesso em: 9 maio. 2019. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022.

CAMPIONI, F.; BERGAMINI, A.M.M.; FALCÃO, J.P. Genetic diversity, virulence genes and antimicrobial resistance of *Salmonella* Enteritidis isolated from food and humans over a 24-year period in Brazil. *Food microbiology*, v.32, n.2, p.254-264, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2003.07.004>>. Acesso em: 10 jun. 2019. doi: 10.1016/j.foodcont.2003.07.004.

CEYLAN, E.; FUNG, D.Y.C. Antimicrobial activity of spices. **Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology**, v.12, n.1, p.1-55, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1745-4581.2004.tb00046.x>>. Acesso em: 10 jun. 2019. doi: 0.1111/j.1745-4581.2004.tb00046.x.

CHEN, S. et al. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Salmonella* serovars isolated from retail meats. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.1, p.1-7, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/aem.70.1.1-7.2004>>. Acesso em: 9 maio. 2019. doi: 10.1128/aem.70.1.1-7.2004.

CLSI. Clinical Laboratory Standards Institute. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-Third Informational Supplement. M100-S23.** CLSI, Wayne, EUA, 2014. Disponível em: <<http://file.qums.ac.ir/repository/mmrc/CLSI2014.pdf>>. Acesso em: 5. jun. 2019.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical microbiology reviews**, v.12, n.4, p.564-582, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/CMR.12.4.564>>. Acesso em: 19. jun. 2019. doi: 10.1128/CMR.12.4.564.

EC-European Commission, 2004. **Commission recommendation of 19 December 2003 concerning a coordinated programme for the official control of food stuffs for 2004.** Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/GA/TXT/?uri=CELEX:32004H0024>. Acesso em 18. fev. 2019.

ESA-European spice association quality Minima document, 2015. Disponível em: <https://www.esa-spices.org/index-esa.html/publications-esa-rev-5-september-2015-sc-update-as-per-esa-tc-27-10-15.pdf>. Acesso em 19. fev. 2019.

EVANGELISTA-BARRETO, N.S. et al. Veiculação de enterobactérias resistentes aos antimicrobianos em frutos do mar. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, v.10, n.2, p.1-15, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.18817/repesca.v10i2.1146>>. Acesso em: 22 maio. 2019. doi:10.18817/repesca.v10i2.1146.

FOGELE, B. et al. Occurrence and diversity of *Bacillus cereus* and moulds in spices and herbs. **Food Control**, v.83, p.69-74, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.05.038>>. Acesso em: 9 jun. 2019. doi: 10.1016/j.foodcont.2017.05.038.

FRENTZEL, H. et al. Phylogenetic and toxinogenic characteristics of *Bacillus cereus* group members isolated from spices and herbs. **Food Control**, v.83, p.90-98, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.12.022>>. Acesso em: 29 abr. 2019. doi: 10.1016/j.foodcont.2016.12.022.

IBM CORP. Released 2017. IBM SPSS Statistics for Windows, version 25.0. Armorek, NY: IBM corp.

KRUMPERMAN, P.H. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v.46, n.1, p.165-170, 1983. Disponível em: <<https://aem.asm.org/content/46/1/165>>. Acesso em: 28 abr. 2019.

LABORCLIN. Manual para antibiograma. **Técnica de difusão por disco**, v.5, n.4, p.1-29, 2011.

LOPEZ, P. et al. Solid-and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.53, n.17, p.6939-6946, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/jf050709v>>. Acesso em: 29 abr. 2019. doi: 10.1021/jf050709v.

MARTINS, A.G.; FERREIRA, C.S. Caracterização das condições higiênico-sanitária das feiras livres da cidade de Macapá e Santana-AP. **Revista Arquivo Científicos**, p.

28–35, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.5935/2595-4407/rac.immes.v1n1p28-35>>. Acesso em: 14 abr. 2019. doi: 10.5935/2595-4407.

MICHELIN A.F. et al. Contaminação por enteropatógenos em pimenta-do-reino moída. **Boletim do Instituto Adolfo Lutz**, v.26, n.1, p.1-3, 2016. Disponível em: <http://www.ial.sp.gov.br/resources/insituto-adolfo-lutz/publicacoes/bial/bial_26/26u_art-1.pdf> Acesso em: 14 abr. 2019.

RASFF - Rapid Alert System for Food and Feed. (2019). **RASFF Portal**. Disponível em: <https://webgate.ec.europa.eu/rasffwindow/portal/index.cfm?event=notificationlist>. Acesso em: 10 de mar 2019.

RASHEED, M.U. et al. Antimicrobial drug resistance in strains of Escherichia coli isolated from food sources. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.56, n.4, p.341-346, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0036-46652014000400012>>. Acesso em: 14 abr. 2019. doi: 10.1590/S0036-46652014000400012.

REGITANO, J.B.; LEAL, R.M.P. Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.34, n. 3, p.601-16, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832010000300002>>. Acesso em: 18 maio. 2019. doi: 10.1590/S0100-06832010000300002.

SEMRET, M.; HARAUI, L.P. Antimicrobial Resistance in the Tropics. **Infectious Disease Clinics of North America**, v.33, n.1, p.231-245, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.009>>. Acesso em: 19 jun 2019. doi: 10.1016/j.idc.2018.10.009.

SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 4ª. ed., Varela, São Paulo, 2010.

SILVA, J.F.M.; FEITOSA, A.C.; RODRIGUES, R.M. *Staphylococcus aureus* em alimentos. **Desafios**, v.4, n.4, p.15-31, 2017. Disponível em: <

<https://doi.org/10.20873/uft.2359-3652.2017v4n4p15>>. Acesso em: 4 abr. 2019. doi: 10.20873/uft.2359-3652.2017v4n4p15.

SEI- Superintendência de Estudos Econômicos e Sociais da Bahia. **Estatísticas dos Municípios Baianos**. v.4, n.1, 2012. Disponível em: https://www.sei.ba.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=2441&Itemid=284. Acesso em: 13 maio 2019.

THANH, M.D. et al. Tenacity of *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in dried spices and herbs. **Food Control**, v.83, p.75-84, 2018. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.12.027>>. Acesso em: 4 abr. 2019. doi: 10.1016/j.foodcont.2016.12.027.

VAN DOREN, J.M. et al. Prevalence, serotype diversity, and antimicrobial resistance of *Salmonella* in imported shipments of spice offered for entry to the United States, FY2007–FY2009. **Food microbiology**, v.34, n.2, p.239-251, 2013. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.10.002>>. Acesso em: 20 jun. 2019. doi: 10.1016/j.fm.2012.10.002.

CAPÍTULO 3

Atividade antimicrobiana do revestimento edível da própolis marrom na pimenta-do-reino

Artigo a ser submetido à Revista Anais da Academia Brasileira de Ciências

Atividade antimicrobiana do revestimento edível da própolis marrom na pimenta-do-reino

Milena da Cruz Costa¹, Alexsandra Iarlen Cabral Cruz¹, Aline Simões da Rocha Bispo¹,
Mariza Alves Ferreira¹, Norma Suely Evangelista-Barreto¹

¹Centro de Ciências Agrárias, Biológicas e Ambiental, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB, Cruz das Almas, Bahia, Brasil.

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antimicrobiano do revestimento da própolis marrom na pimenta-do-reino. Inicialmente foi verificada a atividade antimicrobiana do extrato da própolis frente *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 e *Bacillus cereus* ATCC 14579. Para o revestimento foi usado a suspensão de alginato de sódio mais extrato de própolis marrom nas concentrações de 2,5%, 5%, 10% e 15% na pimenta-do-reino. No controle foi usado apenas água destilada. As amostras foram secas por 72 horas em estufa de circulação de ar a 45 °C e armazenadas a temperatura ambiente (25 °C) por 30 dias. Análises microbiológicas foram realizadas nos intervalos de 0, 10, 20 e 30 dias. A atividade antimicrobiana da própolis marrom mostrou que *S. aureus* foi mais sensível (CIM, 0,1 mg mL⁻¹) e *E. coli* mais resistente (CIM, 18 mg mL⁻¹). Apesar de *B. cereus* apresentar uma CIM de (0,5 mg mL⁻¹), a concentração bactericida foi muito superior (CBM, 150 mg mL⁻¹). O revestimento de própolis na pimenta-do-reino inibiu em 100% os coliformes a 45 °C na menor concentração testada (2,5%). O aumento em 5% de própolis causou uma redução média de aproximadamente 7 vezes na contagem de *B. cereus*, 9,4 para *S. aureus* e 5,4 para as bactérias mesófilas. Em ordem crescente a maior eficiência do revestimento da própolis foi para bactérias mesófilas, *S. aureus* e *B. cereus*. O revestimento de própolis marrom se mostrou eficaz na redução da contagem microbiana da pimenta-do-reino durante o armazenamento, com a concentração de 15% sendo a mais recomendada por até 20 dias de armazenamento.

Palavras-chave: antimicrobiano natural, alginato de sódio, *Piper nigrum* L, *Bacillus cereus*

ABSTRACT: The aim of this study was to evaluate the antimicrobial potential of the brown propolis coating on black pepper. Initially the antimicrobial activity of the propolis extract against *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 and *Bacillus cereus* ATCC 14579 was verified. For the coating the suspension of sodium alginate plus brown propolis extract in the concentrations of 2.5% was used, 5%, 10% and 15% in black pepper. In the control treatment only distilled water was used. The samples were dried for 72 hours in an air circulation oven at 45 °C and maintained at room temperature (25 °C) for 30 days. Microbiological analyzes were performed at 0, 10, 20 and 30 day intervals. The antimicrobial activity of brown propolis showed that *S. aureus* was more sensitive (MIC, 0.1 mg mL⁻¹) and *E. coli* was more resistant (MIC, 18 mg mL⁻¹). Although *B. cereus* presented an MIC (0.5 mg mL⁻¹), the bactericidal concentration was much higher (MBC, 150 mg mL⁻¹). The propolis coating on black pepper inhibited 100% coliforms at 45 °C at the lowest concentration tested (2.5%). The 5% increase in propolis caused an average reduction of approximately 7 times in the *B. cereus* count, 9.4 for *S. aureus* and 5.4 for the mesophilic bacteria. In order of increasing the highest propolis efficiency was for mesophilic bacteria, *S. aureus* and *B. cereus*. The brown propolis coating was effective in reducing the microbial load of black pepper during storage, with a concentration of 15% being the most recommended for up to 20 days of storage.

Key words: natural antimicrobial, shelf life, *Piper nigrum* L, *Bacillus cereus*.

INTRODUÇÃO

A pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) é considerada o “rei das especiarias” na indústria alimentícia devido as suas características de qualidade como sabor picante, cor e aroma. O Brasil se destaca no comércio mundial como um dos maiores produtores da pimenta-do-reino, com os Estados do Pará, Espírito Santo e Bahia contribuindo com a maior produção nacional (Oliveira et al. 2007). Apesar da pimenta-do-reino ser muito apreciada e utilizada em diversas regiões brasileiras, ela pode sofrer contaminação durante a venda no comércio varejista principalmente em feiras livres. A presença de microrganismos como *Salmonella* spp., *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, coliformes a 45 °C e *Staphylococcus aureus* em especiarias pode causar doenças veiculadas por alimentos, além de reduzir o prazo de validade do produto (Hertwig et al. 2015).

Atualmente, dentre as técnicas utilizadas para reduzir a carga microbiana de especiarias, se destaca tratamento com vapor, irradiação e fumigação com óxido de etileno (Golden et al. 2019). Embora eficazes na redução dos microrganismos, estas técnicas afetam a qualidade dos alimentos, como o óxido de etileno, devido a presença de resíduos, motivo pelo qual o seu uso foi proibido na União Europeia (Schweiggert et al. 2007). Outra desvantagem é o elevado custo para os processadores de especiarias em pequena escala.

Uma alternativa segura, simples e atrativa tem sido a aplicação de revestimento edível utilizando compostos naturais com reconhecida atividade antimicrobiana e antioxidante. O revestimento edível é uma fina camada de material comestível aplicada na superfície dos alimentos que age como barreira a contaminação por microrganismos patogênicos, além de aumentar a vida útil do produto (Luvielmo e Lamas 2012). Dentre os polissacarídeos utilizados nos revestimentos comestíveis, o alginato de sódio é um composto atraente devido as suas características de biodegradabilidade, não-tóxico, produtor de gel e um preço relativamente baixo (Bagheri et al. 2019).

A aplicação de revestimentos edíveis em produtos alimentícios tem sido relatada por diversos autores (El-mossalami e Abdel-hakeim 2013, Vargas-Sánchez et al. 2014, Viera et al. 2016, Thamnopoulos et al. 2018). Dentre os antimicrobianos naturais usados na matriz no revestimento se destaca a própolis que além de sua atividade antimicrobiana e antioxidante (Silici e Karaman 2014, Viera et al. 2016) também se destaca por ser reconhecida como substância geralmente segura (GRAS) (Tosi et al. 2007).

A própolis marrom utilizada na presente pesquisa é um produto da apicultura da região do Recôncavo Baiano que apresenta grande potencial devido aos seus compostos bioativos e que é pouca explorada pela comunidade local devido o maior interesse na comercialização do mel. Sabendo que a própolis é rica em compostos fenólicos e que até o momento nenhum estudo foi realizado utilizando a sua aplicação para a conservação de especiarias, este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência do revestimento da própolis marrom no controle do crescimento bacteriano na pimenta-do-reino.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do extrato da própolis

Amostras do extrato de própolis de cor marrom a 30% foi adquirido comercialmente de um entreposto certificado por meio da revendedora Abmel de Cruz das Almas-Bahia, com as seguintes características de acordo com a análise de controle de qualidade indicadas pela Legislação Brasileira: umidade (5,53%), cinzas (1,95%), cera (20,7%), massa mecânica (34,4%), sólidos solúveis em etanol (65,6%), flavonoides totais (1,38 mg EAG/g) e fenóis totais (12,35 mg EQ/g), além do valor para antioxidantes DDPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) (38,12%). Os extratos foram produzidos no município de Cabaceiras do Paraguaçu (12° 32' 08" S 39° 11' 27" W) Bahia na comunidade de Pau Ferro.

Obtenção e preparação das amostras de pimenta

A pimenta-do-reino foi adquirida em feiras livres nos municípios de Cruz das Almas, Cachoeira e Santo Antônio de Jesus no Recôncavo Baiano. As amostras foram acondicionadas em sacos transparentes de polietileno da mesma forma como são disponibilizadas aos clientes. Foram adquiridos um total de 2,5 Kg de pimenta-do-reino (*Piper Nigrum* L.) e encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Ambiental (LABMAA) da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia em Cruz das Almas-BA.

Atividade antibacteriana do extrato de própolis marrom

Para avaliar a atividade antibacteriana foram utilizadas bactérias Gram-positivas, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Bacillus cereus* ATCC 14579 e Gram-negativa, *Escherichia coli* ATCC 25922 pertencentes ao acervo do Laboratório de Microbiologia Ambiental e de Alimentos (LABMAA) localizado no Núcleo de Estudos em Pesca e Aquicultura - NEPA na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB)- Cruz das Almas.

Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato de própolis marrom foi realizada pela técnica de microdiluição em caldo, conforme as normas descritas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (Clsi 2016). Inicialmente, foram distribuídos 100 µL de caldo Muller-Hinton em todos os 96 poços da placa de Elisa. Posteriormente, adicionou-se 100 µL do extrato no primeiro poço e, após

homogeneização, foi transferido para o segundo e assim sucessivamente. A atividade antimicrobiana do extrato foi avaliada em concentrações decrescentes a partir de 300 mg mL⁻¹ até 0,1 mg mL⁻¹.

A concentração do inóculo foi ajustada a 0,5 da Escala McFarland (1,5x10⁸ UFC mL⁻¹) em espectrofotômetro (SP-22 Biospectro[®]) com comprimento de onda de 625 nm e densidade óptica de 0,08 a 0,1. A seguir, foi diluída a suspensão 1:10 com solução salina de 0,85%, obtendo-se como inóculo 1,5x10⁷ UFC mL⁻¹. Posteriormente foram inoculados 10 µL (1,5x10⁵ UFC mL⁻¹) em cada poço. Foi realizado o controle de esterilidade do meio de cultura, do extrato e da viabilidade dos microrganismos. Todos os testes foram realizados em triplicata e as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 24 horas. A confirmação de inibição do crescimento bacteriano foi realizada por meio do método colorimétrico que consiste na adição de 20 µL da solução aquosa do corante rezasurina sódica (Sigma-Aldrich) na concentração de 0,01% em todos os poços da placa. A placa foi incubada 37 °C e após 2 horas procedeu-se a leitura dos resultados. Os poços que permaneceram de cor azul indicaram que não houve crescimento bacteriano.

Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato de própolis marrom

Para determinar a Concentração Bactericida Mínima (CBM), retirou-se uma alíquota de 10 µl de cada poço que não houve crescimento bacteriano visível, semeando-a em placas de Petri contendo ágar Mueller-Hinton, incubadas a 37 °C por 24h. A CBM correspondeu à menor concentração do extrato que não revelou crescimento bacteriano visível (Chen et al. 2018).

Preparação da suspensão de revestimento

Para a obtenção da suspensão de revestimento foi utilizada a metodologia proposta por Oussalah et al. (2006) e Passos et al. (2016) com modificações. O revestimento edível foi preparado utilizando uma suspensão base de alginato de sódio a 1% (AS1%) que foi solubilizado em água destilada estéril à temperatura ambiente sob agitação por 2 h. Em seguida adicionou o glicerol na concentração de 1%. O extrato de própolis marrom (EP) foi adicionado em concentrações de 2,5% (25 mg mL⁻¹) a 15% (150 mg mL⁻¹). A suspensão foi mantida sob agitação por 10 minutos a temperatura ambiente.

Avaliação da vida útil da pimenta-do-reino

As amostras de pimenta (150 g) foram submetidas ao revestimento por imersão durante 1 minuto (Pastor et al. 2011) no (Controle) e nos tratamentos T1 (AS1%+EP2,5%), T2 (AS1%+EP5%), T3 (AS1%+EP10%) e T4 (AS1%+EP15%). Após a imersão, as amostras foram drenadas em uma rede de nylon a 25 °C por 1 h para eliminar o excesso da suspensão de revestimento e, então, foram armazenadas em sacos de papel de primeiro uso em uma estufa com circulação de ar a 40 °C por 72 horas. O experimento foi realizado em triplicata e as análises microbiológicas realizadas durante o período experimental de 0, 10, 20 e 30 dias. As análises de *S. aureus*, *B. cereus*, bactérias mesófilas e coliformes a 45 °C foram realizadas de acordo com o Bacteriological Analytical Manual (BAM) descritas por Silva et al. (2010).

Análise estatística

As variações das taxas de *B. cereus*, *S. aureus*, coliformes a 45 °C e bactérias mesófilas foram analisadas em função da solução de própolis e do período de armazenamento das amostras. Estes dados foram submetidos à análise de variância (teste F) e regressão multilinear. Foi selecionado o modelo de regressão mais representativo com base na significância do teste F ($p < 0,05$), os coeficientes das regressões lineares por meio do teste T de Student ($p < 0,05$) e segundo o coeficiente de determinação mais ajustado do modelo. Para essas análises foi utilizado o procedimento de análise de regressão do programa computacional software SPSS Statistics for Windows, versão 25.0 (Ibm corp, 2017).

RESULTADOS

O extrato de própolis marrom apresentou atividade antimicrobiana frente aos microrganismos testados, e as bactérias Gram-positivas (*B. cereus* e *S. aureus*) apresentaram maior sensibilidade com menores valores da (CIM) do que *E. coli* (Tabela 1). A maior atividade do extrato foi observada para *S. aureus*, tanto para a CIM quanto para a CBM, enquanto a outra bactéria (*B. cereus*) necessitou de uma concentração muito maior do extrato para atingir a CBM (Tabela 1).

Tabela 1. Atividade antimicrobiana do extrato de própolis marrom frente a bactérias Gram-negativa e Gram-positiva.

Microrganismos	Atividade antimicrobiana	
	CIM (mg mL ⁻¹)	CBM (mg mL ⁻¹)
<i>Escherichia coli</i>	18	28
<i>Bacillus cereus</i>	0,5	150
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,1	18

CIM-Concentração mínima inibitória; CBM-Concentração mínima bactericida

Com base nos resultados da atividade antimicrobiana foi escolhido o intervalo para se trabalhar as diferentes concentrações da própolis na etapa do revestimento. Ao se analisar as pimentas tratadas com o revestimento T1 (SA1%+EP2,5%) e T2 (SA1%+EP5%) foi possível perceber uma redução de 100% da carga microbiana para os coliformes a 45 °C durante o período de estocagem, quando comparados ao controle (contagens de 2,66 log NMP g⁻¹ a > 3,04 log NMP g⁻¹).

Na Figura 1 pode-se verificar que aumentos unitários no percentual da concentração da própolis causou uma redução média linear de 0,16982 unidades de logaritmo no número de *B. cereus* independente dos dias de avaliação. Assim, pode-se estimar que o aumento em 5% na concentração da própolis causou em média uma redução de aproximadamente sete vezes na contagem desse microrganismo. Na primeira etapa de avaliação (dia 0), sem adição do revestimento (Controle) a carga observada foi de 5,77 log UFC g⁻¹, todavia ao tratar a pimenta com 15% da solução da própolis (T4) a contagem foi de 3,22 log UFC g⁻¹ com redução de 355 vezes no número de *B. cereus*. Por outro lado, as amostras com 30 dias, sem revestimento (T1) apresentaram uma carga microbiana de 7,96 log UFC g⁻¹ e quando tratado com 15% da solução da própolis (T5) a carga microbiana diminuiu 347 vezes (5,42 log UFC g⁻¹).

Em relação ao efeito dos dias, a análise estatística mostrou que independente das concentrações testadas houve um acréscimo de 0,73 unidades no log do número de *B. cereus* correspondente a cada 10 dias de exposição do produto, o que representa uma taxa de multiplicação estimada em 5,4 vezes no número de *B. cereus* (Figura 1).

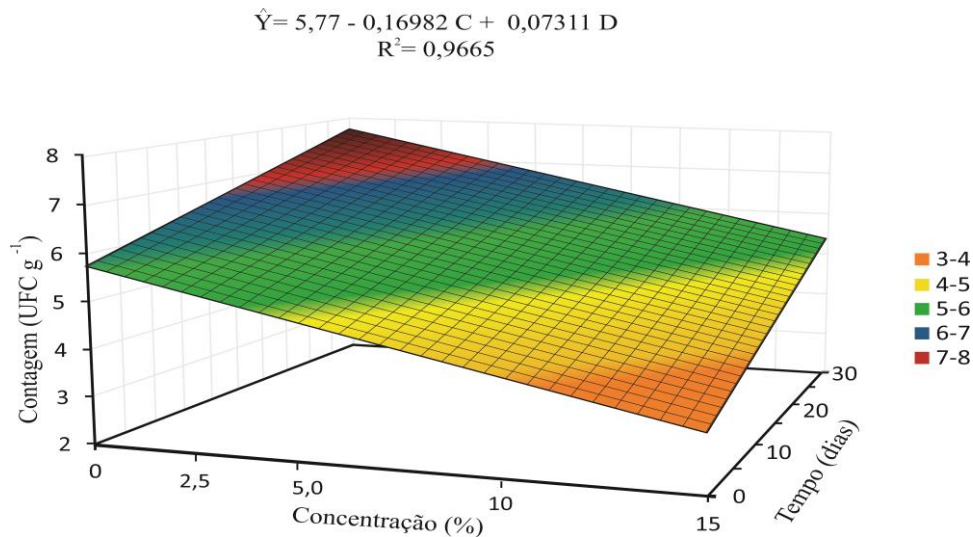


Figura 1. Efeito do revestimento da própolis na pimenta-do-reino para contagem de *Bacillus cereus* durante 30 dias de armazenamento.

Na Figura 2 para *S. aureus* observa-se que acréscimos de 1% na concentração da própolis se estima uma redução de 0,19487 unidades de log na contagem do microrganismo independentemente do tempo de armazenamento das amostras. Portanto, a cada 5% na concentração do produto causou uma redução de 9,4 vezes na carga microbiana de *S.aureus*. Essa redução foi mais elevada quando comparada ao *B. cereus*. Analisando o efeito a cada 10 dias, houve um aumento médio de 0,4812 unidades de log no número de *S. aureus*. Estes valores correspondem a uma elevação de 3 vezes no crescimento do microrganismo.

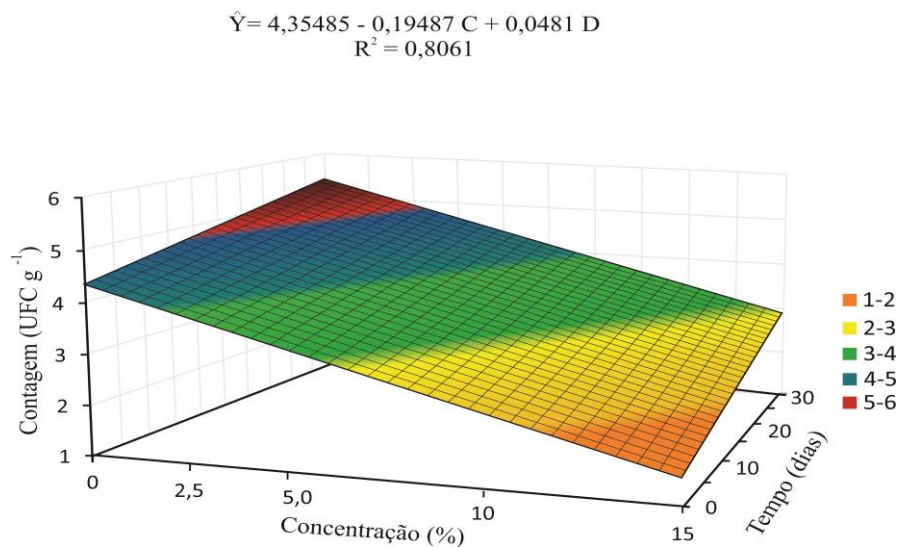


Figura 2. Efeito do revestimento da própolis na pimenta-do-reino para contagem de *Staphylococcus aureus* durante 30 dias de armazenamento.

Para análise de mesófilos (Figura 3), os coeficientes de regressão do modelo indicam que a adição de cada 1% da própolis ocasionou uma redução de 0,14706 unidades de log no número de mesófilos, mostrando também que a cada 5% na concentração da própolis houve um decréscimo médio de 5,4 vezes na contagem. Para o efeito do tempo de armazenamento foi verificado um aumento médio de 0,4318 unidades de log na contagem de bactérias mesófilas a cada 10 dias. Estes resultados indicam que houve crescimento de 2,7 vezes para estes microrganismos e inferior a observada para *S. aureus*.

Analisando os coeficientes de determinação dos modelos foi verificado que 96,65%, 80,61% e 86,04% das variações que ocorreram nas contagens de *B. cereus*, *S. aureus* e bactérias mesófilas, respectivamente, são explicadas por diferenças nas variáveis concentração e tempo. Esses dados revelam que o modelo confere uma elevada representatividade e confiabilidade para os dados pesquisados.

$$\hat{Y} = 5,66 - 0,14706 C + 0,0431 D$$

$$R^2 = 0,8604$$

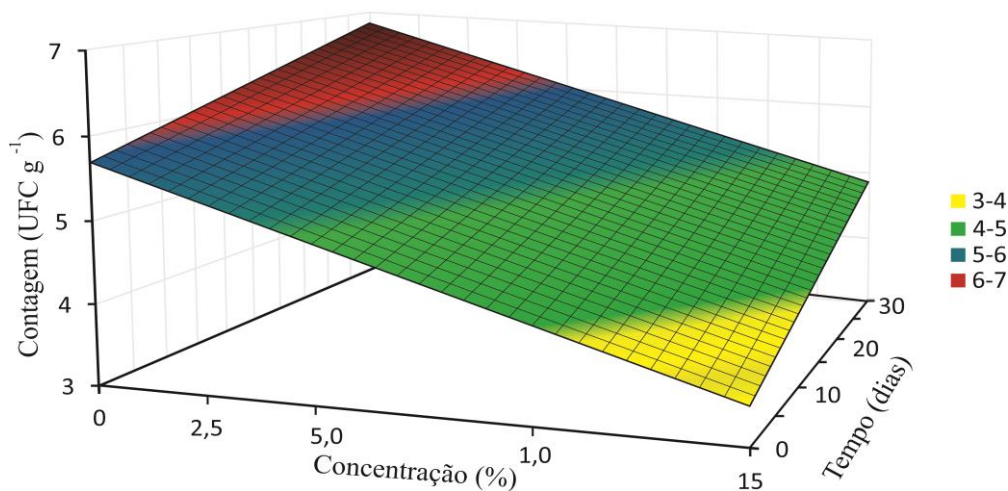


Figura 3. Efeito do revestimento da própolis na pimenta-do-reino para contagem de bactérias mesófilas durante 30 dias de armazenamento.

DISCUSSÃO

A atividade antimicrobiana do extrato da própolis marrom foi comprovada para *E. coli*, *S. aureus* e *B. cereus*. A ação da própolis é atribuída principalmente aos compostos fenólicos (flavonoides e ácidos fenólicos) que são reconhecidos por desempenharem

alguns mecanismos como interferência na divisão celular, com alterações do citoplasma e inibição da síntese de proteínas, responsáveis pela morte das células (Takaisi-Kikuni e Schilcher 1994). Segundo Mirzoeva et al. (1997) outros compostos presentes na própolis como componentes cinâmicos e flavonoides também são capazes de desestabilizar a membrana citoplasmática e inibir a motilidade bacteriana.

O valor da CIM mais elevada (18 mg mL^{-1}) para inibir *E. coli* no teste *in vitro* pode estar ligada à presença da parede celular quimicamente mais complexa dos Gram negativos, com a presença de uma membrana externa de lipopolissacarídeos que dificulta a ação dos compostos fenólicos presente no extrato da própolis (Pinto et al. 2011). Os dados obtidos corroboram com o que já vem sendo relatado na literatura, a menor sensibilidade dos microrganismos Gram-negativos em relação aos Gram-positivos (Sforcin et al. 2000).

A ação da própolis em *S. aureus* ($0,1 \text{ mg mL}^{-1}$) pode estar associado a ação da galangina, composto presente na própolis que atua induzindo a perda de potássio pelas células, causando danos à membrana citoplasmática ou o enfraquecimento da parede celular ocasionando a lise osmótica (Cushnie e Lamb 2005). Resultados mostrando a eficiência da própolis verde frente às cepas de *S. aureus* foram descritos por Chen et al. (2018) ao relatarem baixas CIM ($0,01 \text{ mg/mL}$) e CBM ($0,02 \text{ mg/mL}$) quando comparados com o presente estudo.

Apesar de *B. cereus* apresentar uma CIM baixa, sua CBM foi muito maior (150 mg mL^{-1}), provavelmente devido a capacidade do microrganismo em formar endósporos, os quais são capazes de sobreviver a condições adversas em virtude das várias camadas proteicas que fornecem proteção contra uma variedade de estresses, como tratamentos físicos e químicos de preservação (Abhyankar et al. 2019).

Com relação a etapa de revestimento apesar do tratamento T1 (2,5%) ser eficiente para o grupo coliforme, a concentração antimicrobiana considerada mais eficiente na redução da carga microbiana dos demais bioindicadores foi de 15% (T4) para um período de 20 dias (Icmsf 1974 e Ec 2004), devido o aumento na carga microbiana de *B. cereus* com 30 dias (Figura 1). Uma alternativa para minimizar a resistência dos endósporos de *B. cereus* seria a reaplicação do revestimento a cada 20 dias. Apesar da própolis conter compostos hidrofóbicos que constituem uma película biodegradável na superfície do fruto formando barreira semipermeável, com redução da umidade (Passos et al. 2016) e barreira microbiológica (Sforcin e Bankova 2011) e o alginato de sódio

atuando na adesão do revestimento à superfície de frutas e vegetais, promovendo uma barreira ao oxigênio devido à sua estrutura compacta e ordenada de rede ligada ao hidrogênio (Tapia et al. 2007), acredita-se que o crescimento de *B. cereus* após 20 dias de tratamento ocorreu devido a volatilização dos compostos da própolis.

Estudos sobre a eficiência da própolis com ação antimicrobiana têm sido comprovados em diferentes alimentos. Segundo Alvarez et al. (2015) a pulverização de vegetais minimamente processados (aipó, alho-poró e abóbora) com solução de extrato da própolis apresentou efeito inibitório no crescimento de *E. coli* O157:H7 entre os dias 7 e 10 de armazenamento. Já Kameyama et al. (2008), verificaram que o extrato da própolis exerceu atividade antimicrobiana sobre contaminantes de cenoura minimamente processada até 10 dias de armazenamento.

A aplicação da própolis marrom como revestimento edível se mostrou viável e pode ser uma alternativa para a indústria de alimentos uma vez que essa própolis que é um produto da apicultura tem sido pouco aproveitada na região do recôncavo baiano, devido a falta de informações por parte dos apicultores que direcionam sua produção apenas para o mel. Nesse sentido, a própolis estudada pode ser utilizada pela comunidade local para a conservação de produtos alimentícios em virtude da sua riqueza em compostos bioativos, além de agregar valor a atividade apícola.

Aliado a isso, estender a vida útil da pimenta-do-reino em 20 dias durante o armazenamento aumenta a qualidade microbiológica para os consumidores gerando benefícios para os feirantes uma vez que esse tratamento vem agregar melhorias nas condições higiênicas sanitárias desse produto que é comercializado de forma precária.

CONCLUSÃO

O revestimento edível da própolis marrom se mostrou eficaz na redução da carga microbiana da pimenta-do-reino com o tratamento T4 (SA1%+EP15%) sendo o mais eficiente na redução de *B. cereus*, *S. aureus* e bactérias mesófilas. Dessa forma, o revestimento da própolis marrom melhora a qualidade microbiológica da pimenta-do-reino por até 20 dias de armazenamento.

AGRADECIMENTOS

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e da Fundação de Amparo à Pesquisa do estado da Bahia (FAPESB).

REFERENCIAS

ABHYANKAR WR, WEN J, SWARGE BN, TU Z, BOER R, SMELT JP, KONING LJ MANDERS E, KOSTER CG E BRUL, S. 2019. Proteomics and microscopy tools for the study of antimicrobial resistance and germination mechanisms of bacterial spores. *Food Microbiol* 81: 89-96.

ALVAREZ MV, PONCE AG E MOREIRA MR. Combined effect of bioactive compounds and storage temperature on sensory quality and safety of minimally processed celery, leek and butternut squash. 2015. *J Food Saf* 35: 560-574.

BAGHERI F, RADI M E AMIRI S. 2019. Drying conditions highly influence the characteristics of glycerol-plasticized alginate films. *Food Hydrocolloids* 90: 162-171.

BRASIL. 2001. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº. 12. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Poder executivo. Brasília, DF. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b>. Acesso em: 04 maio 2019.

CHEN YW, YE SR, TING C E YU YH. 2018. Antibacterial activity of propolis from Taiwanese green propolis. *J food drug anal* 26: 61-768.

CLSI -Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals. Approved standard - 26th Edition. M101-S26. Pennsylvania: EUA, 2016. Disponível em: <https://clsi.org/media/2321/vet08ed4_sample.pdf>. Acesso em: 06 de maio 2019.

CUSHNIE TP E LAMB AJ. 2005. Detection of galangin-induced cytoplasmic membrane damage in *Staphylococcus aureus* by measuring potassium loss. *J Ethnopharmacol* 101: 243-248.

DEHGHANI S, HOSSEINI SV E REGENSTEIN JM. 2018. Edible films and coatings in seafood preservation: A review. *Food Chem* 240: 505-513.

EC. European Commission. Commission recommendation of 19 December 2003 concerning a coordinated programme for the official control of food stuffs for 2004. Disponível em: <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/GA/TXT/?uri=CELEX:32004H0024>>. Acesso em: 10 de maio 2019.

EL-MOSSALAMI H E ABDEL-HAKEIM Y.A. 2013. Using of propolis extract as a trial to extend the shelf-life and improving the quality criteria of fresh Egyptian sausage. *J Assiut Vet Med* 59: 23-33.

GOLDEN CE, BERRANG ME, KERR WL E HARRISON MA. 2019. Slow-release chlorine dioxide gas treatment as a means to reduce *Salmonella* contamination on spices. *Innov Food Sci Emerg Technol* 52: 256-261.

HERTWIG C, REINEKE K, EHLBECK J, KNORR D E SCHLÜTER O. 2015. Decontamination of whole *Pepper black* using different cold atmospheric pressure plasma applications. *Food Control* 55: 221-229.

IBM CORP. Released 2017. IBM SPSS Statistics for Windows, version 25.0. Armorek, NY: IBM corp.

ICMSF. 1974. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Microorganisms in foods 2: Sampling for microbiological analysis: principles and specific application. Toronto: University of Toronto Press, 213p.

KADARIYA J, SMITH TC E THAPALIYA D. 2014. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health. *BioMed Res Inter* 2014: 1-9.

KAMEYAMA O, JÚNIOR JA, TEIXEIRA JMA, ANDRADE NJ, MININ VPR E SOARES LS. 2008. Extrato de própolis na sanitização e conservação de cenoura minimamente processada. *Revista Ceres* 55: 218-223.

LUVIELMO MM E LAMAS SV. 2012. Revestimentos comestíveis em frutas. *Estud Tecnol Eng* 8: 8-15.

MIRZOEVA OK, GRISHANIN RN E CALDER PC. 1997. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiol Res* 152: 239-246.

OLIVEIRA RA, OLIVEIRA FF E SACRAMENTO CK. 2007. Óleos essenciais: perspectivas para o agronegócio de especiarias na Bahia. *Rev Bahia Agrícola* 8: 46-48.

OUSSALAH M, CAILLET S, SALMIÉRI S, SAUCIER L E LACROIX M. 2006. Antimicrobial effects of alginate based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. *J Food Prot* 69: 2364-2369.

PASSOS FR, MENDES FQ, CUNHA MC, PIGOZZI MT E CARVALHO AMX. 2016. Propolis extract in postharvest conservation banana prata. *Rev Bras Frutic* 38: 1-2.

PASTOR C, SÁNCHEZ-GONZÁLEZ L, MARCILLA A, CHIRALT A, CHÁFER M E GONZÁLEZ-MARTÍNE C. 2011. Quality and safety of table grapes coated with hydroxypropylmethylcellulose edible coatings containing propolis extract. *Postharvest Biol Tec* 60: 64-70.

PINTO LMA, TAIRONI NR E CARVALHO LB. 2011. Propriedades, uso e aplicações da própolis. *Rev Eletrônica Farm* 7: 76-100.

SCHWEIGGERT U, CARLE R E SCHIEBER A. 2007. Conventional and alternative processes for spice production – a review. *Trends in Food Sci Technol* 18: 260-268.

SFORCIN JM, FERNANDES A, LOPES CA, BANKOVA V E FUNARI SR. 2000. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *J Ethnopharmacol* 73: 243-249.

SFORCIN JM E BANKOVA V. 2011. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs?. *J Ethnopharmacol* 133: 253-260.

SILICI S E KARAMAN K. 2014. Inhibitory effect of propolis on patulin production of *Penicillium expansum* in apple juice. *J Food Process Pres* 38: 1129-1134.

SILVA, N. et al. 2010. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água. 4 ed. Varela: São Paulo, 535p.

TAKAISI-KIKUNI NB E SCHILCHER H. 1994. Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. *Planta Med* 60: 222–227.

TAPIA MS, ROJAS-GRAÜ MA, RODRÍGUEZ FJ, CARMONA JRA E MARTIN-BELLOSO O. 2007. Alginate-and gellan-based edible films for probiotic coatings on fresh-cut fruits. *J Food Sci* 72: 190-196.

THAMNOPOULOS IA, MICHAILIDIS GF, FLETOURIS DJ, BADEKAB AK, MICHAEL G E ANGELIDIS AS. 2018. Inhibitory activity of propolis against *Listeria monocytogenes* in milk stored under refrigeration. *Food Microbiol* 73: 168-176.

TOSI EA, RÉ E, ORTEGA ME E CAZZOLI AF. 2007. Food preservative based on propolis: Bacteriostatic activity of propolis polyphenols and flavonoids upon *Escherichia coli*. *Food Chem* 104: 1025-1029.

VARGAS-SÁNCHEZ RD, TORRESCANO-URRUTIA GR, ACEDO-FÉLIX E, CARVAJAL-MILLÁN E, GONZÁLEZ-CÓRDOVA AF, VALLEJO-GALLAND B., TORRES-LLANEZ MJ E SÁNCHEZ-ESCALANTE A. 2014. Antioxidant and antimicrobial activity of commercial propolis extract in beef patties. **Journal of Food science** 79: 499-1504.

VIERA VB, PIOVESAN N, MORO KIB, RODRIGUES AS, SCAPIN G, ROSA CS E KUBOTA EH. 2016. Preparation and microbiological analysis of Tuscan sausage with added propolis extract. **Food Science and Technology** 36: 37-41.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O consumo das especiarias pimenta-do-reino, canela e orégano comercializadas em feiras livres de municípios do Recôncavo da Bahia oferecem sérios riscos de intoxicação e/ou infecções alimentares devido a presença de microrganismos patogênicos. Além disso, as especiarias podem contribuir com a veiculação de bactérias multiresistentes.

Neste trabalho, o grande problema da contaminação das especiarias foi a presença de *B. cereus* por ser uma bactéria produtora de endósporos e com isso foi mais resistente ao tratamento com própolis. Acredita-se que a reaplicação do tratamento de revestimento a cada 20 dias poderá inibir ou até eliminar os microrganismos, aumentando ainda mais a vida útil da pimenta-do-reino.

Assim, como alternativa para o tratamento das especiarias sugere-se o revestimento edível com outros antimicrobianos naturais, ou até mesmo outros tipos de própolis a fim de verificar se ocorre uma redução mais eficaz na carga microbiana de *B. cereus*. Vale destacar que estudos posteriores podem ser desenvolvidos utilizando revestimentos edíveis com alginato + extrato de própolis como alternativa para a qualidade na conservação de outros produtos alimentícios.